

Aus der
1. Medizinischen Klinik der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. A. Schömig)
und aus dem
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
Arbeitsgruppe Experimentelle Chirurgie
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Gansbacher)

Angefertigt unter der Leitung von
PD Dr. med. M. Seyfarth und
Dr. med. vet. C. Städele

Eingereicht über
Univ.-Prof. Dr. med. vet. M. Stangassinger
Institut für Physiologie, physiologische Chemie und Tierernährung
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Einfluss des $G\alpha_q$ -Proteins auf die myokardiale Infarktgröße der
knochenmarktransplantierten $G\alpha_q$ -Knockout-Maus im Ischämie/Reperfusionsmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Kerstin Winter
aus
Neuburg an der Donau
München, 2006

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent: Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Hirschberger

Tag der Promotion: 10. Februar 2006

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Schrifttum	2
2.1	Myokardinfarkt	2
2.1.1	Ursachen.....	2
2.1.2	Pathogenese.....	2
2.2	Ischämie und Reperfusion.....	3
2.2.1	Pathomechanismen während der Ischämie	3
2.2.2	Reperfusionsschaden.....	4
2.2.3	Mechanismen des Reperfusionsschadens	4
2.2.4	Klinische Manifestation des Reperfusionsschadens	7
2.3	Thrombozyten	8
2.3.1	Morphologie.....	8
2.3.2	Funktionen.....	8
2.4	Bedeutung der Thrombozyten im Rahmen des Ischämie/Reperfusionsschadens	10
2.4.1	Freisetzung chemotaktischer Substanzen.....	11
2.4.2	Interaktion der Thrombozyten mit Endothelzellen	11
2.4.3	Interaktion der Thrombozyten mit Leukozyten	12
2.5	Heterotrimere G-Proteine.....	13
2.5.1	Aufbau und Einteilung	13
2.5.2	Funktion	14
2.5.3	Wege der Signalübertragung.....	15
2.5.4	Vorkommen.....	16
2.6	Gα _q -Protein.....	17
2.6.1	Vorkommen und Funktionen	17
2.6.2	Funktionen im Thrombozyten.....	18
2.6.3	Funktionen im Myokard.....	20
2.7	Die Maus als Tiermodell für myokardiale Ischämie und Reperfusion	23
2.7.1	Vor- und Nachteile gegenüber anderen Tierarten.....	23
2.7.2	Blutversorgung des linken Ventrikels: Vergleich Mensch – Maus	24
2.7.3	Thrombozyten: Vergleich Mensch – Maus.....	26
2.8	Bestrahlung und Knochenmarktransplantation am Mausmodell	27
2.8.1	Hämatopoetische Stammzellen der Maus	27

2.8.2	Bestrahlungs- und Transplantationsregime	28
2.8.3	Hämatopoese im Empfängertier in der Zeit nach der Transplantation	31
2.9	Der Einfluss von G α_q -Protein-Knockout auf die Infarktgröße	31
3	Eigene Untersuchungen	33
3.1	Zielsetzungen	33
3.2	Material und Methoden	34
3.2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	34
3.2.2	Genotypisierung	34
3.2.3	Versuchsablauf	35
3.2.4	Bestrahlung und Knochenmarktransplantation	36
3.2.5	Bestimmung der Rekonstitutionsrate mit dem TaqMan TM -Verfahren	38
3.2.6	Sonographische Messungen	39
3.2.7	Operationsdurchführung	41
3.2.8	Euthanasie und Färbung des Herzgewebes	45
3.2.9	Aufbewahrung und Auswertung der Proben	46
3.2.10	Statistische Auswertung	49
3.3	Ergebnisse	50
3.3.1	Überlebensrate	50
3.3.2	Allgemeine biologische Daten und Rekonstitution	50
3.3.3	Echokardiographie	51
3.3.4	Infarktgröße	53
4	Diskussion	58
4.1	Diskussion der Versuchsdurchführung	58
4.1.1	Die Maus als Tiermodell für myokardiale Ischämie und Reperfusion	58
4.1.2	Durchführung der Knochenmarktransplantation	59
4.1.3	Durchführung der Operation	61
4.2	Diskussion der Ergebnisse	62
4.2.1	Körper- und Herzgewicht	62
4.2.2	Echokardiographie	62
4.2.3	Infarktgröße	63
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	69
5	Zusammenfassung	70
6	Summary	71
7	Literaturverzeichnis	72

8	Tabellenverzeichnis.....	91
9	Abbildungsverzeichnis.....	92
10	Abkürzungsverzeichnis.....	93
11	Danksagung	95
12	Lebenslauf.....	96

1 EINLEITUNG

Nach Angaben des statistischen Bundesamtes stellen Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die bei Weitem häufigste Todesursache in Deutschland dar. Dabei stehen an erster Stelle der Todesursachenstatistik chronisch ischämische Herzerkrankungen, die im Jahr 2003 als Ursache für 10,9 % aller Sterbefälle nachgewiesen wurden, darauf folgt an zweiter Stelle der akute Myokardinfarkt, der für 7,5 % der Sterbefälle in diesem Jahr verantwortlich war (www.gbe-bund.de).

Die Ausdehnung eines Infarktes, der aufgrund einer Ischämie des Myokards entsteht, steht in direktem Zusammenhang mit einem Funktionsverlust des Herzens und Komplikationen in Form von Herzrhythmusstörungen. Daher ist das Ziel der Therapie einer akuten Koronararterienokklusion die Infarktgröße so weit wie möglich zu limitieren. Das Ausmaß des durch die Ischämie entstehenden Infarktes hängt jedoch nicht allein von der Dauer und dem Umfang dieser Ischämie ab, sondern wird zudem durch verschiedene Faktoren während der anschließenden Reperfusion beeinflusst (REIMER und JENNINGS 1992). Neben einer schnellstmöglichen Beseitigung der Arterienokklusion und einer medikamentösen Thrombolyse zur Verhinderung einer Rethrombosierung und einer Embolisierung der Mikrozirkulation könnten durch Substanzen, die in der Lage wären, den progredienten Zelluntergang während der Reperfusion zu verringern, deshalb noch größere Therapie-Erfolge erzielt werden. Aus diesem Grund beschäftigen sich zahlreiche Untersuchungen über myokardiale Ischämie und Reperfusion mit den Auswirkungen verschiedener Moleküle und Interventionen auf die Infarktgröße. So ergab eine bisher unveröffentlichte Studie (HEUER, in Vorbereitung) an einem myokardialen Ischämie/Reperfusions-Modell mit $G\alpha_q$ -Knockout-Mäusen, dass das Fehlen des $G\alpha_q$ -Proteins, das zur intrazellulären Weiterleitung extrazellulärer Signale dient, eine signifikante Limitierung der Infarktgröße bewirkt. Dieses Signalmolekül spielt unter anderem eine wichtige Rolle für die Aktivierung von Thrombozyten, deren Bedeutung für die Entstehung und Ausprägung eines Myokardinfarkts außer Frage steht (OFFERMANN et al. 1997b; GAWAZ 2004). Allerdings ist das $G\alpha_q$ -Protein nicht auf die Thrombozyten beschränkt, sondern wird neben vielen anderen Körperzellen auch von den Kardiomyozyten exprimiert (WILKIE et al. 1991; OFFERMANN et al. 1998).

Die vorliegende Arbeit soll am Mausmodell Aufschluss darüber geben, ob der Einfluss des $G\alpha_q$ -Proteins auf die Infarktgröße nach einer myokardialen Ischämie und Reperfusion auf dessen Wirkungen im Thrombozyten zurückzuführen ist, oder ob das Fehlen dieses Signalmoleküls in anderen Körperzellen, z. B. in den Endothelzellen oder den Kardiomyozyten selbst, eine Limitierung der Infarktgröße zur Folge hat.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Myokardinfarkt

2.1.1 Ursachen

Ein Myokardinfarkt entsteht an Regionen im Herzmuskel, an denen die Kardiomyozyten aufgrund einer schweren oder anhaltenden Ischämie geschädigt werden und durch Nekrose oder Apoptose zugrunde gehen. In seltenen Fällen kann eine solche Minderdurchblutung akut durch Bakterienemboli oder Thromben, die durch Vorhofflimmern oder Verletzungen des Endokards entstehen, ausgelöst werden. Ursachen für chronische koronare Stenosen hingegen sind Erkrankungen wie Polyarteritis nodosa, rheumatische oder rheumatoide Arteritis, Thromboangiitis obliterans oder aber verschiedene Neoplasien. Der bei weitem häufigste Auslöser für eine myokardiale Ischämie und einen daraus entstehenden Myokardinfarkt ist jedoch eine atherosklerotische Vorschädigung der Koronargefäße (REIMER und JENNINGS 1992).

2.1.2 Pathogenese

Unter Atherosklerose versteht man die Ablagerung von Lipiden und fibrösen Bestandteilen am Endothel der Arterien. Sie gilt als Hauptursache für Schlaganfall und verschiedene, kardial bedingte Symptome, unter anderen den Myokardinfarkt (LUSIS 2000).

Die Ätiologie der Atherosklerose setzt sich zusammen aus Faktoren, die eine genetische Komponente beinhalten, und Umweltfaktoren bzw. Lebensgewohnheiten, die die Entstehung und Ausprägung der Krankheit fördern. So steht fest, dass für Menschen, die aus Familien mit einer hohen Inzidenz dieser Erkrankung stammen, ein deutlich größeres Risiko besteht, davon betroffen zu sein (GOLDBOURT und NEUFELD 1986). Von besonderer Bedeutung ist die Zusammensetzung der Lipide im Blut, speziell das Verhältnis von low-density-lipoprotein (LDL) zu high-density-lipoprotein (HDL). Während ein hoher LDL-Spiegel im Blut eine wichtige Rolle für die Entstehung und Progredienz der atherosklerotischen Plaques spielt, wirkt ein hoher HDL-Spiegel diesen Veränderungen entgegen (GORDON und RIFKIND 1989; HOSTMARK et al. 1990). Ein hoher Blutdruck sowie ein bestehender Diabetes mellitus gelten ebenso als Risikofaktoren wie bestimmte Lebensgewohnheiten, zu denen z. B. fettreiche Ernährung, Rauchen, mangelnde körperliche Betätigung und Stress zählen (YUSUF et al. 2004).

Fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen bestehen aus einem oder mehreren extrazellulär lokalisierten Lipid-Kernen, die im Laufe der Zeit von einer Kappe aus glatter Muskulatur und einer extrazellulären Matrix, die von den Muskelzellen gebildet wird, abgegrenzt werden. Diese Verdickungen in der Gefäßintima ragen ins Lumen hinein und können es teilweise

verengen. Allerdings führen sie per se in den wenigsten Fällen zur Entwicklung akuter kardialer Symptome; diese entstehen sekundär durch eine Verletzung und Ruptur einer oder mehrerer solcher fibrösen Kappen und anschließender Bildung eines total oder partiell okklusiven Thrombus (CONSTANTINIDES 1966; FALK 1983; DAVIES und THOMAS 1984; FALK 1985). An der Rupturstelle wird die Gerinnungskaskade eingeleitet. Das geschieht dadurch, dass die subendotheliale Matrix mit den Blutbestandteilen in Berührung kommt, wird aber zusätzlich durch die Expression bestimmter prokoagulatorischer Substanzen, vor allem den tissue factor forciert (MACH et al. 1997). Aus dieser Thrombosierung an der Stelle der Plaque-Erosion entsteht in vielen Fällen eine Obstruktion der Arterie; es können dabei jedoch zusätzlich kleinere Teile des Thrombus abgeschwemmt werden und als Emboli die Mikrozirkulation beeinträchtigen (EL-MARAGHI und GENTON 1980; DAVIES et al. 1986).

2.2 Ischämie und Reperfusion

2.2.1 Pathomechanismen während der Ischämie

Ein Gefäßverschluss aufgrund der oben beschriebenen Veränderungen bewirkt eine Ischämie des Gewebes, das im Versorgungsbereich der betroffenen Arterie liegt. Dadurch, dass kein Sauerstoff und keine Nährstoffe mehr zu den Zellen gelangen, andererseits aber auch deren Stoffwechselprodukte nicht mehr abtransportiert werden, unterliegen diese Zellen sowohl funktionellen als auch strukturellen Veränderungen. Der anaerobe Stoffwechsel führt zu einer Anhäufung von Laktat, Protonen und anorganischem Phosphat und damit zu einer Zellazidose (JENNINGS et al. 1981; REIMER und JENNINGS 1992). Die zellulären Ionenpumpen sind nicht mehr in der Lage, die Homöostase der Elektrolyte aufrecht zu erhalten, woraus sich ein gestörtes Membranpotential entwickelt. Außerdem führt die intrazelluläre Ansammlung von Calcium zur Aktivierung endogener Phospholipasen, die in der Lage sind, die Plasmamembran zu schädigen (NAYLER und ELZ 1986). Auf diese Weise entwickelt sich ein Membranödem und im weiteren Verlauf eine Zellschwellung. Durch die nekrotischen Veränderungen der Kardiomyozyten und der Endothelzellen werden bereits während der Ischämie vermehrt Leukozyten vom geschädigten Gewebe rekrutiert (ENGLER et al. 1986; FORMAN et al. 1990).

Innerhalb weniger Minuten sind die Energiereserven der Zellen in Form energiereicher Phosphatverbindungen wie Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP) und Kreatinphosphat aufgebraucht. Adenosin, das einen potentiellen Vasodilatator darstellt und dessen Konzentration im Lumen von intakten Endothelzellen durch Aufnahme und Abgabe kontrolliert wird, unterliegt nach und nach einem Abbau zu den Purinen Xanthin und Hypo-

xanthin (JENNINGS et al. 1981). Außerdem gehen den einzelnen Zellen wichtige Enzyme verloren: Von besonderer Bedeutung für den anschließenden Reperfusionsschaden ist hierbei der Verlust bestimmter Schutzmechanismen gegen freie Radikale. Zu diesen Enzymen, die in der Lage sind, Sauerstoff-Radikale in weniger reaktive Verbindungen abzubauen, zählen vor allem die Superoxid-Dismutase, die Glutathion-Peroxidase und die Katalase (FERRARI et al. 1985).

2.2.2 Reperfusionsschaden

Es ist offensichtlich, dass der einzige Weg, diesen massiven Gewebsuntergang aufzuhalten, die möglichst rasche und vollständige Wiederherstellung der physiologischen Durchblutung des betroffenen Gebietes ist. Allerdings geht man seit einigen Jahrzehnten davon aus, dass die Reperfusion den Zellen zusätzlichen Schaden zufügt. Der so genannte „Reperfusionsschaden“ ist eine häufig gebrauchte Bezeichnung. Sie wird für verschiedene zelluläre Mechanismen in Folge einer vorangegangenen Ischämie oder auch für deren klinische Auswirkungen verwendet (NAYLER und ELZ 1986; HEARSE et al. 1993). Ob jenen Veränderungen aber tatsächlich Schädigungen des Gewebes, die durch die Reperfusion an sich entstanden sind, zugrunde liegen, oder ob die während der Ischämie entstandenen pathologischen Veränderungen durch die Reperfusion lediglich beschleunigt werden, ist schwierig zu beurteilen. Es lässt sich sehr schwer voneinander abgrenzen, ob Kardiomyozyten, die während einer Ischämiephase reversibel geschädigt werden, erst durch die anschließend wiedereinsetzende Durchblutung endgültig zugrunde gehen, oder ob diese Zellen bereits aufgrund der Ischämie irreversible Schäden davontragen, die durch die einsetzende Reperfusion nicht mehr kompensiert werden können (MAXWELL und LIP 1997).

2.2.3 Mechanismen des Reperfusionsschadens

Für den Reperfusionsschaden werden im Wesentlichen zwei Phänomene verantwortlich gemacht: ein vermehrter Calcium-Einstrom in die Kardiomyozyten und die Bildung hochreaktiver Sauerstoffradikale, die von den Zellen nicht abgebaut werden können (MAXWELL und LIP 1997).

Calcium-Overload

Bereits während der Ischämie entwickelt sich ein Ca^{2+} -Overload der Kardiomyozyten; durch die entstehende Zellazidose wird der Na^+/H^+ -Transporter aktiviert, woraus primär ein Anstieg des intrazellulären Na^+ resultiert. Dieses wird wiederum vom $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in den Extrazellulärraum befördert, mit der Folge einer Ca^{2+} -Anhäufung in den Zellen. Vor allem die Mitochondrien tolerieren einen erhöhten Ca^{2+} -Spiegel schlecht: Er führt zum Verlust des

mitochondrialen Membranpotentials, wodurch die Apoptosekaskade in Gang gesetzt wird. Außerdem ist er in der Lage, intrazelluläre Phospholipasen zu aktivieren und damit vor allem die Zellmembran zusätzlich zu schädigen (TESHIMA et al. 2003). Nach Meinung einer Arbeitsgruppe um KUSUOKA führt eine durch diesen Ca^{2+} -Overload verstärkte Aktivität der transmembranären Ca^{2+} -Transporter, die dieses Ca^{2+} zurück in den extrazellulären Raum verbringen, zudem zu einem gesteigerten Energieverbrauch der geschädigten Zellen und damit zu einer „Entkopplung“ der Beziehung zwischen Sauerstoffverbrauch und Kontraktion des Herzmuskels nach Einsetzen der Reperfusion (KUSUOKA et al. 1990).

Reaktive Sauerstoffradikale

Der zweite wichtige Pathomechanismus des Reperfusionsschadens hängt mit der plötzlich einsetzenden Bereitstellung von molekularem Sauerstoff zusammen: Aus diesem werden in den Zellen hochreaktive freie Radikale gebildet (HESS und MANSON 1984; McCORD 1985). Die Zellen sind jedoch durch den oben beschriebenen Verlust wichtiger Schutzenzyme bereits während der Ischämie schlecht gegen diesen oxidativen Stress gewappnet. Im physiologischen Zustand werden Superoxid-Anion-Radikale zum großen Teil von der zellulären Superoxid-Dismutase in Wasserstoffperoxid, dieses Peroxid von der Katalase letztendlich zu Wasser und Sauerstoff umgewandelt und damit unschädlich gemacht (McCORD und FRIDOVICH 1978; FRIDOVICH 1983; vgl. Abb. 1). Aufgrund des Verlusts der genannten Zellenzyme während der Ischämie kann der Abbau dieser Verbindungen nicht mehr stattfinden.

In früheren Forschungen wurde für die Entstehung dieser Radikale vor allem das Enzym Xanthin Oxidase/Dehydrogenase verantwortlich gemacht. Dieses liegt physiologisch zum größten Teil als Dehydrogenase vor, durch die Ischämie verschiebt sich das Verhältnis zugunsten der Oxidase; aufgrund der Ansammlung von Xanthin und Hypoxanthin aus Adenosin steht diesem Enzym zu Beginn der Reperfusion viel Substrat zur Verfügung, was zu einer hohen Produktion von Superoxid-Anion-Radikalen führt (FRIDOVICH 1983; CHAMBERS et al. 1985; vgl. Abb. 2).

Nach neueren Erkenntnissen stellen vor allem Leukozyten, die bei ihrer Aktivierung freie Radikale freisetzen, sowie massive Störungen in der mitochondrialen Atmungskette weitere wichtige Quellen für hochreaktive Verbindungen dar (VANDEN HOEK et al. 1997).

Folgen dieser Pathomechanismen

Der zelluläre Ca^{2+} -Überschuss und die Produktion freier Radikale verstärken sich gegenseitig in ihren Auswirkungen auf die Struktur und die Funktion der Zellen.

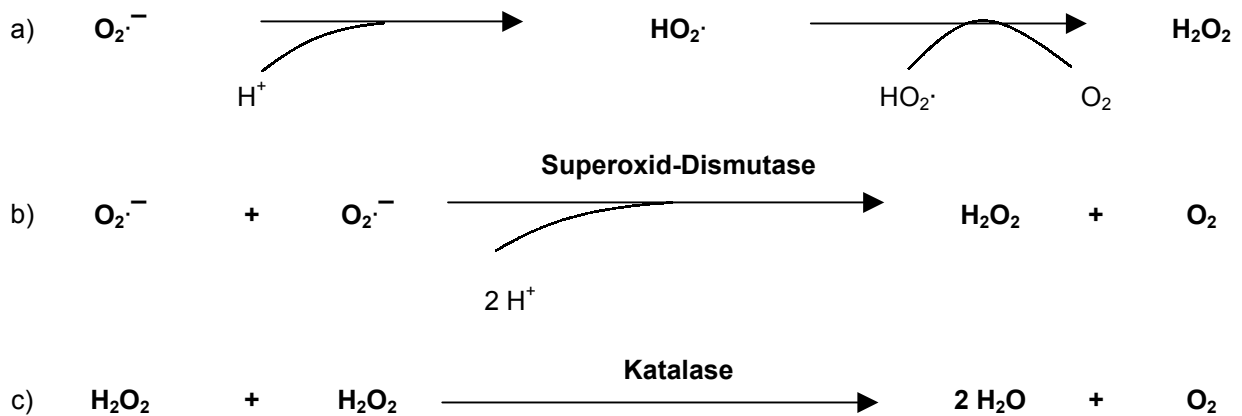


Abb. 1: Verschiedene Abbaupfade reaktiver Radikale (modifiziert nach McCORD und FRIDOVICH 1978 und FRIDOVICH 1983)

- a) spontane Reaktion des Superoxid-Anions unter Bildung eines Wasserstoffperoxidmoleküls
- b) Umwandlung des Superoxid-Anions durch die Superoxid-Dismutase in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid
- c) Umwandlung von Wasserstoffperoxid durch die Katalase in Wasser und Sauerstoff

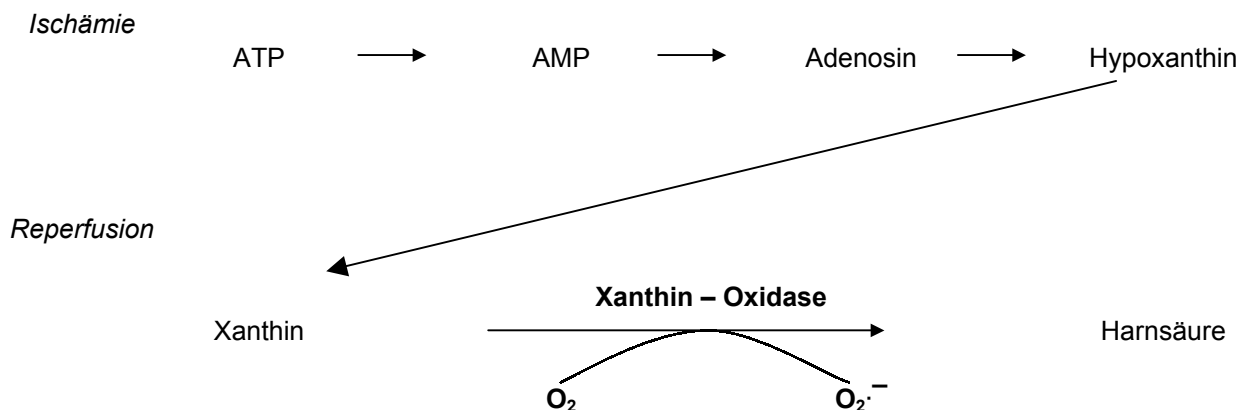


Abb. 2: Entstehung von Superoxid-Anionen durch die Umwandlung des während der Ischämie vermehrt gebildeten Xanthins zu Harnsäure; katalysiert wird diese Reaktion von der Xanthin-Oxidase (modifiziert nach FRIDOVICH 1983 und CHAMBERS et al. 1985).

Es kommt, nicht zuletzt durch Oxidation der Membranlipide sowie Schädigung der Mitochondrien aufgrund des Ca^{2+} -Überschusses und der Freisetzung freier Radikale, zu einer endothelialen Dysfunktion mit einer erhöhten Permeabilität und zur beschleunigten Nekrose von Kardiomyozyten (LUM et al. 1992). Dies bewirkt eine verstärkte Einwanderung neutrophiler Granulozyten. Einige Studien beschäftigen sich damit, inwiefern deren Einwanderung und Aktivierung nicht zuletzt durch Thrombozyten begünstigt wird (LEFER et al. 1998; KOGAKI et al. 1999; siehe auch Kap. 2.4). Durch eine Störung der Mikrozirkulation

aufgrund von Zellverklumpungen ebenso wie aufgrund der Freisetzung vasokonstriktorischer Substanzen haben die Thrombozyten einen bedeutenden Anteil an dem so genannten „no-reflow“-Phänomen, das bereits von KRUG et al. (1966) und von KLONER et al. (1974) beschrieben wurde. Der Begriff steht für die Tatsache, dass nach einer kurzen Hyperämie-Phase zu Beginn der Reperfusion die Durchblutung kontinuierlich wieder abnimmt, obwohl der ursprüngliche Auslöser der Ischämie beseitigt wurde. Dieses Phänomen ist nach einer mindestens 30-minütigen Ischämiephase zu beobachten, und ist, neben den oben genannten Gründen, auf Struktur- und Funktionsänderungen, auf Protrusionen des Endothels sowie auf den Verschluss kleinster Kapillaren durch Schwellung und Kontraktion der Kardiomyozyten zurückzuführen (HEARSE et al. 1993).

2.2.4 Klinische Manifestation des Reperfusionsschadens

“myocardial stunning“

Eine klinische Manifestation des Reperfusionsschadens ist eine verringerte linksventrikuläre Ejektionsfraktion, die unter dem Begriff „myocardial stunning“ von BRAUNWALD und KLONER (1982) beschrieben wurde. Diese myokardiale Dysfunktion wird zu Beginn der Reperfusion beobachtet, ist allerdings vollständig reversibel und darf deshalb nicht als permanenter Schaden verstanden werden (MAXWELL und LIP 1997).

Arrhythmien

Arrhythmien während der Reperfusion werden in tierexperimentellen Studien regelmäßig beobachtet (MAXWELL und LIP 1997). Im klinischen Fall jedoch scheinen Arrhythmien eher durch eine lange Ischämiephase als durch die anschließende Reperfusion verursacht zu werden (HACKETT et al. 1990).

Komplikationen nach erfolgter Thrombolyse

Inwiefern die bedeutendsten klinischen Auswirkungen, nämlich Komplikationen nach einer erfolgreichen Thrombolyse aufgrund massivem Gewebsunterganges, auf die Reperfusion per se oder auf die vorangegangene Ischämiephase zurückzuführen sind, ist schwierig zu beurteilen, wie bereits zu Beginn des Kapitels dargestellt wurde. Unabhängig von dem genauen Zeitpunkt der Gewebsschädigung konnte jedoch gezeigt werden, dass insbesondere Störungen der Mikrozirkulation und eine unvollständige Durchblutung des Gewebes nach einer erfolgreichen Thrombolyse mit einer schlechten Prognose für den Patienten verbunden sind (WU et al. 1998).

2.3 Thrombozyten

2.3.1 Morphologie

Menschliche Thrombozyten sind im ruhenden Zustand diskoide, anukleäre Zellen mit einem Durchmesser von ca. zwei bis vier Mikrometer. Werden sie durch verschiedene Stimuli aktiviert, ändert sich ihre Form: Sie bilden Pseudopodien aus und werden zu so genannten Echinosphärozyten. An diesem „shape change“ ist die Anordnung der Mikrotubuli in den Pseudopodien und eine Polymerisierung des Strukturproteins Aktin maßgeblich beteiligt. Diese Formänderung bewirkt vor allem eine Oberflächenvergrößerung, aber auch eine Zentralisierung der Organellen (GAWAZ 1999). Neben Mitochondrien und Glykogenspeichern besitzen die Thrombozyten drei verschiedene Typen von Granula: dichte Granula, α -Granula und Lysosome. Dichte Granula enthalten unter anderem Adenin- und Guaninnukleotide, divalente Kationen (wie Ca^{2+}), Serotonin und Histamin. Wichtige Inhaltsstoffe der α -Granula sind u. a. prokoagulatorische Substanzen, wie z. B. Faktor V, adhäsive Proteine, wie Fibrinogen, Proteine mit zytokinähnlichen Eigenschaften, wie β -Thromboglobulin, Plättchenfaktor 4 und Wachstumsfaktoren, wie Platelet-derived-growth-factor und Transforming-growth-factor (HARRISON und CRAMER 1993; GAWAZ 1999; RENDU und BROHARD-BOHN 2001; siehe auch Tab. 1). Für die unterschiedlichen Aufgaben der Thrombozyten sind außerdem zahlreiche verschiedene Membranproteine und das so genannte „dichte tubuläre System“, das als intrazellulärer Calcium-Speicher fungiert, von besonderer Bedeutung (GAWAZ 1999).

2.3.2 Funktionen

Die primäre Hämostase, in deren Verlauf ein fragiler Thrombozytenpfropf gebildet wird, lässt sich funktionell in verschiedene Schritte unterteilen:

1. Adhäsion
2. Aggregation
3. Aktivierung
4. Sekretion

Adhäsion

Die Adhäsion der Blutplättchen an die subendotheliale Matrix geschieht durch bestimmte Rezeptoren auf der Thrombozytenmembran, die entweder direkt an freiliegende extrazelluläre Matrixbestandteile, wie z. B. Kollagen, Fibronectin und Laminin, binden oder indirekt über den von-Willebrandt-Faktor (vWF). Da letzterer eine hohe Affinität zu seinem Rezeptor an der Thrombozytenmembran, dem GP-Ib-IX-V-Komplex, besitzt, ist diese Bindung am bedeutendsten für Bereiche des Gefäßsystems, in denen hohe Scherkräfte herrschen (ROTH 1991;

SAVAGE et al. 1998; BERNDT et al. 2001). Diese primäre Anbindung des Thrombozyten ans Endothel ist durch eine hohe Dissoziationsrate gekennzeichnet und muss im weiteren Verlauf durch andere Rezeptorbindungen stabilisiert werden. Hierbei spielt vor allem das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ eine wichtige Rolle (WEISS et al. 1986; JACKSON et al. 2003; GAWAZ 2004; RUGGERI 2004). Für eine stabile Bindung der Blutplättchen an Kollagen, aber auch bereits für die initiale Adhäsion sind außerdem der so genannte Kollagenrezeptor, das Glykoprotein VI (GPVI) und das Integrin $\alpha_2\beta_1$ essentiell (SAVAGE et al. 1998; MASSBERG et al. 2003; ANDREWS et al. 2004; LECUT et al. 2004).

Aggregation

Nach dieser Adhäsion an die subendotheliale Matrix werden weitere Blutplättchen rekrutiert; deren Anlagerung an die bereits adhärenen Thrombozyten wird als Aggregation bezeichnet. Auch hierbei spielt das aktivierte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ eine wichtige Rolle, indem es über Fibrinogenbrücken die einzelnen Thrombozyten anfangs lose, im weiteren Zeitverlauf fester miteinander verbindet. Dafür ist die Aktivierung dieses Rezeptors notwendig, da er im ruhenden Zustand nicht an lösliches Fibrinogen bindet: Diese Bindung wird erst durch ein „inside-out-signaling“ ermöglicht, d. h. intrazelluläre Vorgänge, in diesem Falle ein erhöhter Ca^{2+} -Spiegel, führen den membranständigen Rezeptor in einen aktivierten Zustand über (PATEL et al. 2003; RUGGERI 2004).

Aktivierung und Sekretion

Die Aktivierung, die zum oben beschriebenen „shape change“ der Zelle führt, geschieht einerseits schon durch die Adhäsion, wird aber durch lösliche Agonisten verstärkt oder kann durch jene unabhängig von einer Bindung ausgelöst werden. Bei diesen Agonisten handelt es sich vor allem um ADP, Thromboxan A_2 und Thrombin. Die Kopplung dieser Moleküle an entsprechende Rezeptoren der Thrombozytenmembran führt über meist G-Protein-vermittelte Signalkaskaden zu einer Erhöhung des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels und damit zur Aktivierung des Thrombozyten (KROLL und SCHAFFER 1989; BRASS et al. 1997; GACHET 2001). Auch die Freisetzung der Granulainhaltsstoffe wird durch einen auf diese Weise erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel ausgelöst (RENDU und BROHARD-BOHN 2001).

Durch die Sekretion der chemotaktischen Inhaltsstoffe ihrer Granula sowie durch direkte Bindung und Interaktionen sowohl mit den Endothelzellen als auch mit den Leukozyten sind Thrombozyten jedoch nicht nur an der Blutstillung, sondern auch an Entzündungsreaktionen beteiligt (KLINGER und JELKMANN 2002).

Tab. 1: Inhaltsstoffe der thrombozytären Granula nach Angaben von GAWAZ (1999) und Rendu und Brohard-Bohn (2001)

dichte Granula	α -Granula	Lysosome
Nukleotide	adhäsive Proteine	Enzyme
Adenosintriphosphat	Fibrinogen	Heparinase
Adenosindiphosphat	Fibronectin	α -Arabinosidase
Guanosintriphosphat	von-Willebrand-Faktor	α -Mannosidase
Guanosindiphosphat	Thrombospondin	β -Galactosidase
Bivalente Kationen	Vitronectin	β -Glucuronidase
Calcium	P-Selektin	β -N-Acetylglucosaminidase
Magnesium	Glykoprotein IIb/IIIa	Elastase
Amine	Wachstumsfaktoren	Kollagenase
Histamine	Platelet-derived growth factor	Kathepsin D, E
Serotonin	Transforming growth factor β	Karboxypeptidase
Sonstiges	Epidermal growth factor	
Pyrophosphate	Endothelial cell growth factor	
	zytokinähnliche Proteine	
	β -Thromboglobulin	
	Plättchenfaktor 4	
	Koagulationsfaktoren	
	Kininogen	
	Plasminogen	
	Koagulationsfaktor V, VII, XI, XIII	
	Protein S	
	Enzyme	
	α_1 -Antitrypsin	
	α_2 -Makroglobulin	
	α_2 -Antiplasmin	
	C1-Esterase-Inhibitor	
	Sonstige	
	Albumin	
	Immunglobulin G, A, M	

2.4 Bedeutung der Thrombozyten im Rahmen des Ischämie-/Reperfusionsschadens

Wie bereits in Kap. 2.2 dargestellt, trägt eine Inflammation des Gewebes zur Schädigung des Myokards im Rahmen einer Ischämie und Reperfusion bei. Allerdings bringt diese Entzündungsreaktion nicht nur negative Konsequenzen mit sich. Sie muss in erster Linie als eine Reaktion des Organismus betrachtet werden, durch die eine Heilung und Wiederherstellung des geschädigten Gewebes erreicht werden soll (ENTMAN et al. 2000; FRANGOGIANNIS et al. 2002).

Dennoch scheinen vor allem Störungen im Bereich der Mikrozirkulation aufgrund entzündlicher Reaktionen eben diese Heilung zu beeinträchtigen (HEARSE et al. 1993; HANSEN 1998; GAWAZ 2004). Dazu tragen Thrombozyten in mehrerer Hinsicht bei: Einerseits bewirken sie durch die Freisetzung bestimmter Mediatoren direkt eine Vasokonstriktion.

Zu diesen Mediatoren zählen

- Adenosintriphosphat,
- Adenosindiphosphat,
- Thromboxan A₂,
- Serotonin.

Andererseits fördern sie durch die Freisetzung chemotaktischer Substanzen, aber auch durch direkte Interaktionen mit Endothelzellen und Leukozyten eine Einwanderung und Aktivierung von Entzündungszellen und potenzieren damit eine inflammatorische Reaktion (KLINGER und JELKMANN 2002).

2.4.1 Freisetzung chemotaktischer Substanzen

Chemotaktische Verbindungen sind vor allem bestimmte Inhaltsstoffe der Granula, die bei der Aktivierung freigesetzt werden. Hierzu gehört aus den dichten Granula das Serotonin, das chemotaktisch auf humane Leukozyten und außerdem vasokonstriktorisch wirkt (SANDLER, et al. 1975; LABERGE et al. 1996). Die α -Granula enthalten mehrere dieser Substanzen: Hierbei sind vor allem β -Thromboglobulin, das als Chemokin für neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten fungiert, Plättchenfaktor 4, der in Anwesenheit von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α) auf neutrophile Granulozyten wirkt, Epitheliales-Neutrophilen-aktivierendes-Protein (ENA) sowie Wachstumsfaktoren, z. B. Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF) und Transforming-Growth-Factor- β (TGF- β), die chemotaktisch auf glatte Muskelzellen, Makrophagen, Monozyten und Fibroblasten wirken, zu nennen (HARRISON und CRAMER 1993; POWER et al. 1995; BRANDT et al. 2000; SCHENK et al. 2002). Weiterhin enthalten Blutplättchen wichtige Mediatoren wie das Zytokin Interleukin 1 β (IL1 β), und CD40-Ligand (CD40L), die eine Adhäsion und Migration der Leukozyten am Endothel vorantreiben (HAWRYLOWICZ et al. 1991; HENN et al. 1998).

2.4.2 Interaktionen der Thrombozyten mit Endothelzellen

Thrombozyten sind in der Lage, an intaktem Endothel zu adhären und dessen Funktion zu modulieren (GAWAZ et al. 1997; BOMBELI et al. 1998; HENN et al. 1998). Für den ersten losen Kontakt werden Selektine, vor allem das P-Selektin, welches während der Ischämie auf den Endothelzellen exprimiert wird, verantwortlich gemacht. Auch aktivierte Thrombozyten können dieses Selektin an ihrer Oberfläche tragen, für die Anbindung an das Endothel scheint aber dieses thrombozytäre Selektin keine Rolle zu spielen (MASSBERG et al. 1998). Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass während der Reperfusionsphase am intakten Endothel kumulierendes Fibrinogen diese Plättchenadhäsion verstärkt; diese Tatsache führen die Auto-

ren auf eine Bindung des endothelialen Interzellulären-Adhäsions-Molekül-1 (ICAM-1) über Fibrinogenbrücken mit dem thrombozytären Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ zurück (BOMBELI et al. 1998; MASSBERG et al. 1999).

Durch diese Bindung der Thrombozyten an das Endothel werden die Blutplättchen aktiviert und führen durch Mikrothromben zu einer verminderten Gewebsperfusion; außerdem sind die Thrombozyten dabei in der Lage, durch Substanzen, wie beispielsweise Interleukin 1 oder CD40 Ligand, Leukozyten direkt oder indirekt über eine Beeinflussung des Endothels zu rekrutieren und damit die inflammatorische Infiltration des Gewebes zu potenzieren (HAWRYLOWICZ et al. 1991; HENN et al. 1998).

2.4.3 Interaktionen der Thrombozyten mit Leukozyten

Nicht nur über Zytokine, Wachstumsfaktoren und eine Aktivierung des Endothels wirken Thrombozyten auf die weißen Blutzellen ein, sondern sie sind darüber hinaus in der Lage, mit diesen Zellen direkten Kontakt herzustellen. Dieser wird durch das sogenannte P-Selektin vermittelt, welches die aktivierten Thrombozyten auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dieses Selektin bindet an den P-Selektin-Glycoprotein-Ligand-1 (PSGL-1), den entsprechenden Rezeptor auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten (YEO et al. 1994; EVANGELISTA et al. 1996; EVANGELISTA et al. 1999; KOGAKI et al. 1999). Durch eine weitere Bindung zwischen dem thrombozytären ICAM-1 und dem CD11b/CD18-Molekül der Leukozyten wird diese Interaktion gefestigt. An der Stabilisierung dieser Bindung ist nach einer Studie von KUPATT et al. (2002) auch das Glykoprotein II_bIII_a beteiligt. Dadurch werden die Entzündungszellen nicht nur in direkte Nähe zum Endothel gebracht, sondern auch deren Bindung an das Endothel und die Freisetzung proinflammatorischer Substanzen begünstigt (BLANKS et al. 1998; NISHIJAMA et al. 2004).

Wie wichtig diese Interaktionen zwischen Leukozyten und Thrombozyten in Bezug auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden sind, zeigt eine Studie von LEFER et al. (1998) an isolierten, perfundierten Rattenherzen: Der koronare Blutfluss und Parameter für die Herzleistung, wie die linksventrikuläre Druckentwicklung, waren nach einer Ischämie- und anschließender Reperusionsphase bei Herzen, die gleichzeitig mit Thrombozyten und Leukozyten perfundiert wurden, hochsignifikant geringer als bei solchen, an denen eine Perfusion mit nur einem der beiden Zelltypen durchgeführt wurde. Zwar behaupten SELIGMANN et al. (2003) das Gegenteil, aber die Arbeitsgruppe um KUPATT et al. (2000) kommt in einer Studie an perfundierten Meerschweinherzen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass eine Inhibierung der Interaktionen zwischen den beiden Zelltypen eine im Vergleich zur Kontrollgruppe deutliche Verbesserung der Herzfunktion bewirkt.

2.5 Heterotrimere G-Proteine

2.5.1 Aufbau und Einteilung

Bei den so genannten heterotrimeren Guanylnukleotid-bindenden-Proteinen (G-Proteine) handelt es sich um Proteine, die aus drei nicht identischen Untereinheiten aufgebaut sind. Diese werden als α -, β - und γ - Untereinheit bezeichnet. Da die beiden Letztgenannten allerdings fest verbunden sind, als funktionelle Einheit gelten und nur unter denaturierenden Bedingungen dissoziieren, werden sie auch als $\beta\gamma$ -Komplex bezeichnet. Es existieren mindestens 20 verschiedene α -, fünf verschiedene β - und zwölf verschiedene γ -Einheiten. Während dabei die Gruppe der β -Polypeptide bis auf eine Ausnahme sehr homogen ist, unterscheiden sich die verschiedenen γ -Untereinheiten strukturell deutlicher voneinander (OFFERMANN 2003). Die heterogenen α -Untereinheiten werden nach ihrer Struktur und Funktion in vier Familien eingeteilt (vgl. Tab. 2): $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{12/13}$. Obwohl man heute davon ausgeht, dass auch der $\beta\gamma$ -Komplex bestimmte Funktionen der G-Proteine vermitteln kann, teilt man das gesamte Heterotrimer nach dieser einen Untereinheit ebenfalls in die vier Untergruppen ein, unabhängig davon, wie der $\beta\gamma$ -Komplex zusammengesetzt ist (SIMON et al. 1991; WILKIE et al. 1992; NEVES et al. 2002).

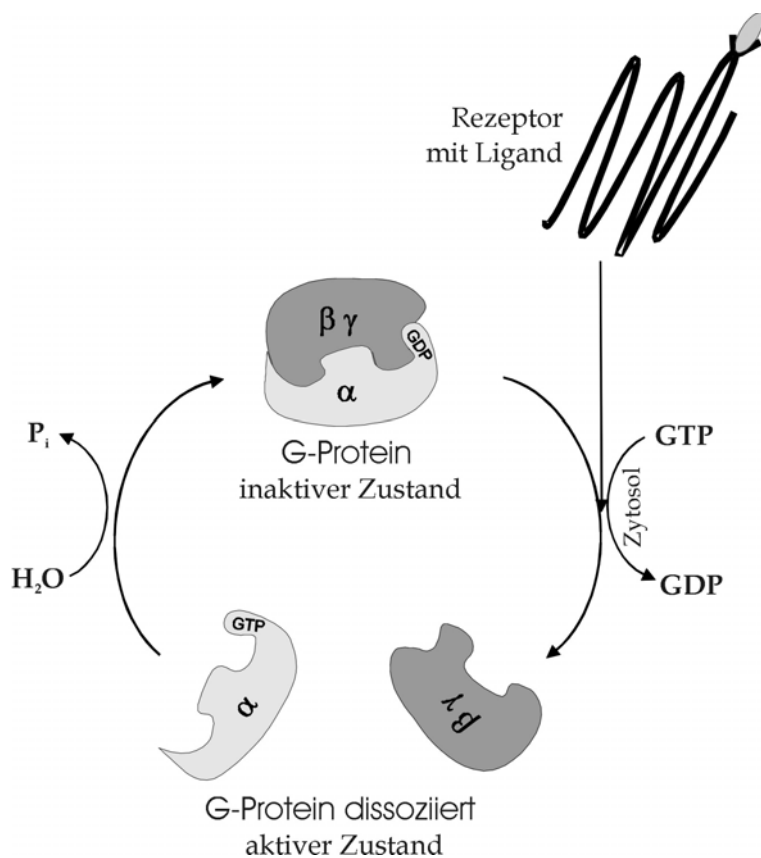
Tab. 2: Einteilung der α -Untereinheiten der G-Proteine nach OFFERMANN (2003)

α -Untereinheit	codierendes Gen	Expression
$G\alpha_s$-Familie		
$G\alpha_s$	Gnas	überall
$G\alpha_{sXL}$	Gnasx1	Neuroendokrinum
$G\alpha_{olf}$	Gna1	Riechepithel, Gehirn
$G\alpha_{i/o}$-Familie		
$G\alpha_{i1}$	Gnai1	weit verbreitet
$G\alpha_{i2}$	Gnai2	überall
$G\alpha_{i3}$	Gnai3	weit verbreitet
$G\alpha_o$	Gnao	Neuroendokrinum, Neuronen
$G\alpha_z$	Gnaz	Neuronen, Thrombozyten
$G\alpha_{gust}$	Gnag	Zellen des Tastsinns
$G\alpha_{t-r}$	Gnat1	Zellen des Tastsinns, Stäbchen der Retina
$G\alpha_{t-c}$	Gnat2	Zäpfchen der Retina
$G\alpha_{q/11}$-Familie		
$G\alpha_q$	Gnaq	überall
$G\alpha_{11}$	Gna11	fast überall
$G\alpha_{14}$	Gna14	Niere, Lunge, Milz
$G\alpha_{15/16}$	Gna15	Hämatopoetische Zellen
$G\alpha_{12/13}$-Familie		
$G\alpha_{12}$	Gna12	überall
$G\alpha_{13}$	Gna13	überall

2.5.2 Funktion

Die Aufgabe der G-Proteine besteht darin, dass sie extrazelluläre Signale intrazellulär weiterleiten. Dazu interagieren sie mit bestimmten, so genannten G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCR). Diese Rezeptoren bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette mit sieben Transmembran-Helices, wobei das N-terminale Ende extrazellulär, das C-terminale im Zytosol liegt (DOHLMANN et al. 1987; BRASS et al. 1997; BOCKAERT und PIN 1999).

Im inaktiven Zustand liegt das G-Protein als Trimer vor, an die α -Untereinheit ist dabei ein Guanosindiphosphat (GDP)-Molekül gebunden. Bindet ein Agonist an den GPCR, aktiviert dieser das G-Protein: das GDP-Molekül wird abgespalten und durch ein Guanosintriphosphat (GTP)-Molekül aus dem Zytosol ersetzt. Die dadurch entstehende Konformationsänderung des G-Proteins führt zu einer Dissoziation der α -Untereinheit (mit dem gebundenen GTP-Molekül) vom $\beta\gamma$ -Komplex. In diesem Zustand können sowohl die α -Einheit als auch das $\beta\gamma$ -Dimer mit weiteren Proteinen in der Zelle interagieren. Dadurch wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt und die Funktion bestimmter Enzyme der Zelle reguliert.



Durch die Bindung eines Liganden an den G-Protein-gekoppelten-Rezeptor wird ein GTP-Molekül aus dem Zytosol gegen das GDP der α -Untereinheit des G-Proteins ausgetauscht. Die α -Untereinheit dissoziiert vom $\beta\gamma$ -Komplex, damit befindet sich das Signalprotein im aktivierten Zustand. Das an die α -Untereinheit gebundene GTP wird durch die GTPase-Aktivität dieser Untereinheit abgespalten, was eine Rückkehr des α -Monomers zum $\beta\gamma$ -Komplex bewirkt.

Abb. 3: Aktivierung der G-Proteine (modifiziert nach Angaben von OFFERMANN 2003)

Beendet wird diese Aktivierung des G-Proteins durch die GTPase-Aktivität der α -Untereinheit: Es wird ein Phosphat abgespalten, das daraus entstehende GDP-Molekül bleibt mit dem α -Monomer verbunden und letzteres kehrt zum $\beta\gamma$ -Komplex zurück (vgl. Abb. 3). So befindet sich das G-Protein wieder in seinem Ausgangszustand und kann erneut aktiviert werden (STRATHMANN und SIMON 1990; SIMON et al. 1991; BRASS et al. 1997; OFFERMANN 2003).

2.5.3 Wege der Signalübertragung

Die G-Proteine der vier Familien nutzen verschiedene Wege, Signale intrazellulär weiterzuleiten. Das bedeutet jedoch nicht, dass jede Untergruppe genau eine bestimmte Signalkaskade auslöst; vielmehr können sie sich hierbei ergänzen und überschneiden. Jede Zelle besitzt bis zu zehn verschiedene G-Proteine, was die Erforschung der komplexen Reaktionen auf bestimmte Signale von außen schwierig gestaltet (NEVES et al. 2002; OFFERMANN 2003).

G α_s -Proteine

Bereits 1971 wurde der Zusammenhang zwischen GTP und einer Aktivierung der Adenylatzyklase entdeckt (RODBELL et al. 1971). Dieser gehört zur klassischen Signalübertragung der G α_s -Proteine; deren α_s -Untereinheit aktiviert die Adenylatzyklase, die ihrerseits zur Aktivierung der Protein-Kinase-A (PKA) führt. Dieses Enzym hat Einfluss auf metabolische Funktionen der Zelle, wie z. B. den Glykogenstoffwechsel, auf Ionenkanäle, aber auch - durch Phosphorylierung bestimmter Transkriptionsfaktoren - auf die Genexpression (SIMON et al. 1991; WILKIE et al. 1992).

G $\alpha_{i/o}$ -Proteine

Durch die α_i -Untereinheit wird die Adenylatzyklase inhibiert. Das scheint allerdings nicht der einzige Weg, den die Proteine der G $\alpha_{i/o}$ -Gruppe nutzen: Während ihre α -Monomere außerdem mit der Tyrosin-Kinase c-Src interagieren können, leitet auch ihr $\beta\gamma$ -Komplex extrazelluläre Signale weiter, indem er unter anderem Isoformen der Phospholipase C β (PLC- β), die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und bestimmte Ionenkanäle reguliert (NEVES et al. 2002).

G $\alpha_{q/11}$ -Proteine

Die Signalübertragung durch G $\alpha_{q/11}$ -Proteine (vgl. Abb. 4) ist der typische Weg, der in eine Erhöhung des zytosolischen Calcium-Spiegels mündet. Dazu aktiviert die α -Untereinheit bestimmte Isoformen der Phospholipase C β (PLC- β); diese katalysiert die Spaltung des Membran-Phospholipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in die Botenstoffe

Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). Das bewirkt die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern (durch IP_3), aber auch die Aktivierung der Protein-Kinase-C (PKC, durch DAG), die ihrerseits weitere verschiedene Zielproteine phosphoryliert (STRATHMANN und SIMON 1990; SIMON et al. 1991; HEPLER et al. 1993; NEVES et al. 2002).

G $\alpha_{12/13}$ -Proteine

Die Mitglieder der $G\alpha_{12/13}$ -Familie interagieren mit verschiedenen Proteinen, unter anderem mit Tyrosin-Kinasen und kleinen GTPasen wie Ras, der Proteinkinase C, aber auch dem Na^+/K^+ -Austauscher, wobei der genaue Signalablauf für einige dieser Interaktionen nicht vollständig geklärt scheint (GU et al. 2002; NEVES et al. 2002).

2.5.4 Vorkommen

Jede Zelle besitzt mehrere Rezeptortypen, die an verschiedene G-Proteine koppeln (s. o.). Von den verschiedenen Signalproteinen gibt es einige, die auf bestimmte Gewebe beschränkt sind, wie zum Beispiel $G\alpha_{olf}$ aus der $G\alpha_s$ -Familie oder $G\alpha_{gust}$ aus der $G\alpha_{i/o}$ -Gruppe auf Zellen des Geruchs- bzw. Geschmackssinnes. Andere Beispiele sind, nach heutigem Wissensstand, $G\alpha_{15/16}$ (aus der $G\alpha_{q/11}$ -Familie), welche bisher nur in hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden konnten, oder $G\alpha_o$ (aus der $G\alpha_{i/o}$ -Familie), welche vor allem von Zellen des ZNS aber auch von anderen Geweben wie Herz, Schilddrüse oder Pankreas exprimiert werden. Viele Vertreter dieser Signalmolekülgruppe dagegen sind nach heutigem Wissen in allen Zellen des Organismus zu finden: Als Beispiele hierfür gelten unter anderem $G\alpha_s$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$, und auch $G\alpha_q$ (SIMON et al. 1991; GU et al. 2002; OFFERMANN 2003).

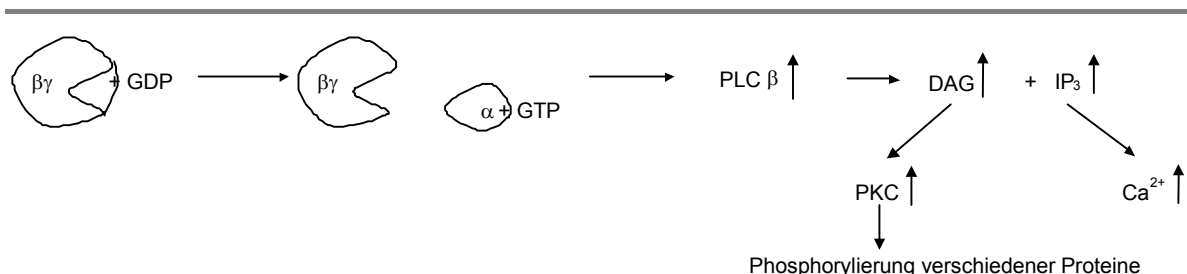


Abb. 4: Signalübertragung durch das $G\alpha_{q/11}$ -Protein: Die Bindung eines GTP-Moleküls aus dem Zytosol an die α -Untereinheit bewirkt eine Dissoziation dieser Untereinheit vom $\beta\gamma$ -Komplex. Die α -Untereinheit aktiviert die Phospholipase C β (PLC β). Dieses Enzym setzt sowohl Diacylglycerin (DAG) als auch Inositol 1-,4-,5-triphosphat (IP_3) frei. IP_3 führt zu einer Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels, DAG zur Aktivierung der Phosphokinase C (PKC), die ihrerseits weitere Zielproteine phosphoryliert (modifiziert nach Angaben von NEVES et al. 2002).

2.6 $G\alpha_q$ -Protein

2.6.1 Vorkommen und Funktionen

$G\alpha_q$ wird von allen Körperzellen exprimiert. Wie in Kap. 2.5 beschrieben wirkt es in erster Linie über Isoformen der PLC- β . Allerdings scheint ein enger Zusammenhang zu dem $G\alpha_{11}$ -Protein aus der gleichen Familie zu bestehen: Diese beiden G-Proteine sind in den meisten Geweben in der Lage, die gleichen Rezeptoren zu koppeln und die PLC- β zu aktivieren, so dass sich ihre Funktionen ergänzen (STRATHMANN und SIMON 1990; WANGE et al. 1991; ARAGAY et al. 1992; LEE et al. 1992; WU et al. 1992; OFFERMANNNS et al. 1994b). Um beurteilen zu können, ob die Funktion der einen $G\alpha$ -Untereinheit durch die andere vollständig ersetzt werden kann, wurden sowohl $G\alpha_{11}$ - als auch $G\alpha_q$ -Knockout-Mäuse untersucht (vgl. Tab. 3). Dabei stellte sich heraus, dass Mäuse, denen $G\alpha_{11}$ fehlt, fertil sind und keine auffälligen morphologischen Besonderheiten aufweisen (OFFERMANNNS et al. 1998). In der o. g. Studie wurden außerdem $G\alpha_q$ - und $G\alpha_{11}$ -Knockout-Tiere miteinander gekreuzt; so konnte unter anderem gezeigt werden, dass Tiere, die nur ein Wildtyp-Allel der insgesamt vier Allele für die beiden $G\alpha$ -Gene besitzen ($G\alpha_q^{(-/-)}$ und $G\alpha_{11}^{(+/+)}$ oder $G\alpha_q^{(+/+)}$ und $G\alpha_{11}^{(-/-)}$), spätestens ein bis zwei Stunden nach der Geburt sterben; sind allerdings zwei Allele davon intakt, sind die Tiere lebensfähig, unabhängig davon, von welchem $G\alpha$ -Gen diese Allele stammen ($G\alpha_q^{(+/+)}$ und $G\alpha_{11}^{(+/+)}$ oder $G\alpha_q^{(+/-)}$ und $G\alpha_{11}^{(+/-)}$ oder $G\alpha_q^{(-/-)}$ und $G\alpha_{11}^{(+/-)}$). Das bestätigt den engen Zusammenhang zwischen der Signalübertragung durch $G\alpha_{11}$ und $G\alpha_q$. Dieser führt allerdings nicht so weit, dass die beiden Proteine vollständig austauschbar wären. So zeigt sich zum Beispiel bei Mäusen, die nur ein intaktes Allel besitzen, durchaus ein Unterschied, von welchem Gen das Allel stammt: Besitzen sie nur ein einzelnes intaktes Allel des $G\alpha_{11}$ -Gens, leiden sie an kraniofazialen Defekten. Dies trifft nicht für $G\alpha_{11}$ -Knockout-Tiere mit nur einem intakten $G\alpha_q$ -Allel zu (OFFERMANNNS et al. 1998). Während außerdem, wie beschrieben, $G\alpha_{11}$ -Knockout-Mäuse morphologisch unauffällig sind, leiden Tiere mit einem $G\alpha_q$ -Gendefekt an Ataxien und verzögerter Blutgerinnung (OFFERMANNNS et al. 1997b). Die Ataxien führt OFFERMANNNS (2003) vor allem auf Störungen bei der Reizweiterleitung zu Purkinje-Zellen im Kleinhirn zurück. Dabei beruft er sich auf eine Studie, die zeigt, dass sowohl $G\alpha_{11}$ als auch $G\alpha_q$ dort zusammen mit dem so genannten metabotropischen Glutamat-Rezeptor (mGluR1) und der Phospholipase C β exprimiert werden (TANAKA et al. 2000). Er stellt die Hypothese auf, dass die Menge an $G\alpha_{11}$ in den Purkinje-Zellen nicht ausreichend wäre, das fehlende $G\alpha_q$ zu kompensieren.

Eine neuere Studie von HARTMANN et al. (2004) belegt diese Vermutung. Aufgrund immunhistochemischer und quantitativer molekulargenetischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Expression von $G\alpha_q$ in einzelnen Purkinje-Zellen bis zu 75-fach höher ist als die von $G\alpha_{11}$. Das erklärt folgendes Ergebnis derselben Studie: So konnte zwar in $G\alpha_{11}$ -defizienten Purkinje-Zellen ein bestimmtes dendritisches Calcium-Signal durch Stimulierung des mGluR1-Rezeptors ausgelöst werden, nicht aber in $G\alpha_q$ -defizienten, obwohl beide $G\alpha$ -Untereinheiten von diesem Rezeptor in gleicher Weise aktiviert werden können und auf dem selben Weg Signale weiterleiten. Das ist eine Erklärung für die von OFFERMANN et al. (1997b) beobachteten Ataxien der $G\alpha_q$ -Knockout-Mäuse. Allerdings konnte die Arbeitsgruppe um HARTMANN et al. (2004) u. a. mithilfe spezieller Motorik-Koordinations-Tests ebenfalls motorische Defizite bei $G\alpha_{11}$ -Knockouts feststellen – wenngleich diese wesentlich geringer sind als die der $G\alpha_q^{(-/-)}$ -Varianten und deshalb ohne genauere Untersuchung nicht auffallen (OFFERMANN et al. 1998).

2.6.2 Funktionen im Thrombozyten

Funktionen der $G\alpha_q$ -Untereinheit

Die Störungen der primären Hämostase bei $G\alpha_q$ -Knockout-Mäusen wiesen OFFERMANN et al. (1997b) in vivo dadurch nach, dass sie den Tieren ein Stück der Schwanzspitze abschneiden. Dabei zeigen die $G\alpha_q^{(-/-)}$ -Mäuse eine deutlich verlängerte Blutungszeit im Vergleich zu ihren Wildtyp-Artgenossen. Außerdem stirbt ein Teil der Neugeborenen mit diesem Defekt kurz nach der Geburt an intra-abdominalen Blutungen, was die Arbeitsgruppe auf kleinere Verletzungen, die durch den Geburtsvorgang entstehen, zurückführt. Der Grund für diese Blutgerinnungsstörung besteht darin, dass Thrombozyten – im Gegensatz zu den meisten anderen Körperzellen – nur $G\alpha_q$, nicht aber $G\alpha_{11}$ exprimieren. Diese Besonderheit, die auch für ausgereifte Erythrozyten zutrifft, wurde von MILLIGAN et al. bereits 1993 beschrieben und durch Nachweis von m-RNA mithilfe spezies-spezifischer Primer sowohl für die Maus als auch für den Menschen bestätigt (JOHNSON et al. 1996). In-vitro-Versuche mit $G\alpha_q^{(-/-)}$ -Thrombozyten zeigten, dass die Agonisten Kollagen, Thrombin, Thromboxan A_2 (TxA_2) und ADP bei diesen weder eine Aggregation noch eine Degranulation auslösen können, während sie bei Wildtyp-Thrombozyten in gleichen Konzentrationen zu beiden Reaktionen führen. Eine Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung ergab, dass auf Stimuli wie Thrombin, TxA_2 und ADP eine massive Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels in Wildtyp-Thrombozyten erfolgt; diese bleibt bei fehlendem $G\alpha_q$ aus. Allerdings sind Thrombozyten trotz des $G\alpha_q$ -Defekts in der Lage, auf Kollagen, TxA_2 und Thrombin, nicht aber auf ADP mit ihrer Formänderung,

dem „shape change“ zu reagieren (OFFERMANN et al. 1997b; OHLMANN et al. 2000). Das zeigt, dass für die Signalweiterleitung im Thrombozyten nicht nur G-Proteine der $G\alpha_{q/11}$ -Familie zuständig sind.

Zusammenspiel verschiedener G-Proteine im Rahmen der Thrombozyten-Aktivierung

Außer $G\alpha_q$ werden in den Blutplättchen Mitglieder der restlichen drei Familien, $G\alpha_i$, $G\alpha_{12/13}$ ebenfalls zur Aktivierung, $G\alpha_s$ zur Inhibierung exprimiert. Diese G-Proteine zur Thrombozyten-Aktivierung koppeln an Rezeptoren der löslichen Agonisten. Es existieren mindestens drei Rezeptoren für ADP, von denen zwei die Signale über G-Proteine weiterleiten, einer ($P2Y_1$) über $G\alpha_q$, der andere ($P2Y_{12}$) über $G\alpha_i$. Der TxA_2 -Rezeptor (TP) existiert in zwei Isoformen ($TP\alpha$ und $TP\beta$), die beide an $G\alpha_q$, aber auch an $G\alpha_{12/13}$ koppeln (MURUGAPPAN et al. 2004). Die Thrombin-Rezeptoren (PAR-1 und PAR-4 auf Mäuse-thrombozyten, PAR-3 und PAR-4 auf humanen Thrombozyten) nutzen die G-Proteine aller drei Familien zur Signalweiterleitung (OFFERMANN et al. 1994a; KLAGES et al. 1999; OFFERMANN 2000). Schon diese unterschiedliche Rezeptor-Spezifität zeigt, dass für eine bestimmte Funktion, wie zum Beispiel die Aggregation oder den „shape change“, nicht nur ein einziger Signalweg und nicht ein bestimmtes G-Protein notwendig ist. Vielmehr ist es ein Zusammenspiel der verschiedenen Rezeptoren und ihren entsprechenden Signal-vermittelnden Proteinen, das letztendlich zur vollständigen Aktivierung führt. Zahlreiche Studien der letzten Jahre belegen diese Tatsache, indem sie, fokussiert auf ein bestimmtes G-Protein oder einen entsprechenden Rezeptor am Thrombozyten, mehr oder weniger dessen Unfehlbarkeit für die volle Funktion der Blutplättchen beweisen. So zeigen NIESWANDT et al. (2002), dass zwar Kollagen eine Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$, welches essentiell für die Thrombozyten-Aggregation ist (vgl. Kap. 2.3), durch $G\alpha_i$ und $G\alpha_{12/13}$ in Abwesenheit von $G\alpha_q$ auslösen kann. Dies trifft aber nicht für die löslichen Agonisten zu. Eine andere Arbeitsgruppe untersuchte die Freisetzung der Inhaltsstoffe aus den α -Granula in Zusammenhang mit verschiedenen Agonisten und fand heraus, dass der $G\alpha_i$ - zusammen mit dem $G\alpha_q$ -Signalweg bereits die Degranulation bewirken kann, wobei aber diese Wirkung durch die zusätzliche Aktivierung von $G\alpha_{12/13}$ potenziert wird (QUINTON et al. 2004). Ein weiteres Beispiel ist der „shape change“, der bei $G\alpha_q$ -Knockout-Tieren nicht beeinträchtigt scheint: bei geringen Konzentrationen eines TxA_2 -Agonisten (U46619), wird er durch $G\alpha_{13}$ vermittelt. Bei Thrombozyten, denen hingegen $G\alpha_{13}$ fehlt, kann durch hohe Konzentrationen von U46619 dieser „shape change“ durch Aktivierung von $G\alpha_q$ ausgelöst werden (MOERS et al. 2004).

Tab. 3: Vergleich der verschiedenen $G\alpha_q$ - und $G\alpha_{11}$ -Knockout-Kreuzungen anhand bestimmter Parameter nach Angaben von OFFERMANNNS et al. (1997b) und OFFERMANNNS et al. (1998)

Genotyp	Überlebens- Fähigkeit	kraniofaziale Defekte	kardiale Malformation	Ataxien	Blutgerinnungs- Störung
$G\alpha_q^{(-/-)}+G\alpha_{11}^{(-/-)}$	— — —	keine Angaben	+ + +	-	+ + +
$G\alpha_q^{(+/-)}+G\alpha_{11}^{(-/-)}$	+ — —	— — —	+ — —	keine Angaben	keine Angaben
$G\alpha_q^{(-/-)}+G\alpha_{11}^{(+/-)}$	— — —	+ + —	+ + —	keine Angaben	keine Angaben
$G\alpha_q^{(+/+)}+G\alpha_{11}^{(-/-)}$	+ + +	— — —	— — —	+ — —	— — —
$G\alpha_q^{(-/-)}+G\alpha_{11}^{(+/+)}$	+ + —	— — —	— — —	+ + +	+ + +
$G\alpha_q^{(+/+)}+G\alpha_{11}^{(+/+)}$	+ + +	— — —	— — —	— — —	— — —

Unabhängig davon jedoch, wie komplex das Zusammenspiel zwischen den einzelnen Signalproteinen ist, bewirkt das Fehlen von $G\alpha_q$ und die damit verbundene Störung der Thrombozyten-Aktivierung nicht nur eine verzögerte Blutgerinnung: $G\alpha_q$ -Knockout-Mäuse überleben die Injektion einer thrombogenen Mischung aus Kollagen und Adrenalin, an welcher Wildtyp-Tiere innerhalb von fünf Minuten aufgrund schwerer Thromboembolien in der Lunge sterben (OFFERMANNNS et al. 1997b).

2.6.3 Funktionen im Myokard

Entwicklung des Herzens

Im Gegensatz zum Thrombozyten exprimieren alle Zellen des Herzwebes sowohl $G\alpha_q$ als auch $G\alpha_{11}$ (WILKIE et al. 1991; OFFERMANNNS et al. 1998). Sie spielen vor allem eine wichtige Rolle für die Entwicklung des Herzens. So sterben Embryonen, deren Gene für beide $G\alpha$ -Untereinheiten deletiert sind ($G\alpha_q^{(-/-)}$ und $G\alpha_{11}^{(-/-)}$), um den zehnten Tag der Trächtigkeit ab. Die Untersuchung solcher Embryonen ergab, dass sie ab Tag 9,5 an einer schwerwiegenden Ausdünnung des Myokards leiden; Risse in diesem unterentwickelten Herzmuskelgewebe führen zur Einblutungen in den Herzbeutel. Mäuse mit nur einem intakten Allel der beiden Gene ($G\alpha_q^{(+/-)}$ und $G\alpha_{11}^{(-/-)}$ oder $G\alpha_q^{(-/-)}$ und $G\alpha_{11}^{(+/-)}$) sterben bis auf wenige Ausnahmen (etwa 4 % der Tiere mit einem intakten $G\alpha_q$ -Allel überleben bis zum Erwachsenenalter) innerhalb von ein bis zwei Stunden post partum. Auch sie zeigen eine deutliche Malformation des Herzens, wobei diese häufiger und schwerwiegender bei Mäusen der $G\alpha_q^{(-/-)} + G\alpha_{11}^{(+/-)}$ Variante als bei Tieren mit nur einem intakten $G\alpha_q$ -Allel auftritt (OFFERMANNNS et al. 1998).

$G\alpha_{q/11}$ und myokardiale Hypertrophie

Versuche mit Agonisten, wie z. B. Angiotensin II, die über $G\alpha_{q/11}$ an Herzmuskeln koppeln und eine intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung bewirken, zeigten bei embryonalen Wildtyp-Kardio-

myozyten deutlich den erwarteten Effekt. Herzmuskelzellen mit einem Doppel-Knockout reagieren mit keinerlei Ca^{2+} -Anstieg. Bei Zellen mit nur einem intakten Allel ist diese Reaktion deutlich reduziert; aber auch Kardiomyozyten mit zwei intakten Allelen ($G\alpha_q^{+/-}$ und $G\alpha_{11}^{+/-}$ oder $G\alpha_q^{(-/-)}$ und $G\alpha_{11}^{+/+}$ oder $G\alpha_q^{+/+}$ und $G\alpha_{11}^{(-/-)}$) reagierten in dieser Studie nicht in gleichem Ausmaß wie die Kontrollgruppe, obwohl morphologisch bei diesen Tieren kein Entwicklungsdefekt am Herzen auffällt (OFFERMANN et al. 1998). Die in der Studie verwendeten Agonisten gehören zu einer Reihe von Mediatoren, denen eine Beteiligung an der Entwicklung der myokardialen Hypertrophie zugeschrieben wird. Sie werden unter anderem bei mechanischer Überlastung des Herzens gebildet und stimulieren das Zellwachstum der einzelnen Kardiomyozyten; zu ihnen zählen zum Beispiel Angiotensin II, Norepinephrin und Endothelin I (MILANO et al. 1994; HEIN et al. 1997; SAKATA et al. 1998). Da die Rezeptoren dieser Moleküle an $G\alpha_{q/11}$ koppeln, wurde daran geforscht, welche Rolle diese G-Proteine für die Ausbildung einer Hypertrophie aufgrund mechanischer Überlastung des Herzens spielen. Zahlreiche Studien an transgenen Mäusen, die $G\alpha_q$ im Herzen überexprimieren, und an neonatalen Kardiomyozyten in Kultur bewiesen, dass eine verstärkte $G\alpha_q$ -Aktivierung eine Hypertrophie des Myokards bewirkt (D'ANGELO et al. 1997; MENDE et al. 1998; SAKATA et al. 1998; BAI et al. 2004). Unter anderem gelang es einer Arbeitsgruppe, mithilfe gentechnologischer Methoden die Exprimierung eines nicht funktionellen Teils des $G\alpha_q$ -Proteins im Kardiomyozyten von Mäusen zu erreichen; dieses Polypeptid hemmt durch eine Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren kompetitiv die Aktivierung von $G\alpha_q$. Das Myokard solcher Tiere reagiert auf eine chirurgisch durch eine gezielte Konstriktion der Aorta herbeigeführte Erhöhung der Nachlast mit einer deutlich weniger ausgeprägten Hypertrophie als das der Kontrollgruppe (AKTHER et al. 1998). Einen endgültigen Beweis dafür, dass aber nicht nur allein durch eine chronische Aktivierung von $G\alpha_q$ -Proteinen im Herzmuskel eine Hypertrophie ausgelöst werden kann, sondern dass diese Signalmoleküle essentiell für die Entstehung der Hypertrophie sind, erbrachten WETTSCHURECK et al. (2001). An Mäusen, denen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ in den Kardiomyozyten fehlt, zeigten sie, dass solche Tiere trotz eines erhöhten ventrikulären Druckes, ausgelöst durch eine gezielte Konstriktion der Aorta, keine myokardiale Hypertrophie entwickeln.

Weiterführende Versuche mit transgenen Mäusen, die $G\alpha_q$ in verschiedenen Ausmaßen im Kardiomyozyten überexprimieren, führten zu der Erkenntnis, dass sich einerseits ab einer gewissen Menge des Proteins eine spontane Hypertrophie entwickelt. Andererseits kann bei den auf diese Weise hypertrophierten Herzen zusätzlich eine systolische Dysfunktion beobachtet werden. Tiere, die $G\alpha_q$ in sehr hohem Ausmaß exprimieren, entwickeln im Alter zwischen 11

und 14 Wochen bereits eine Tachypnoe und sterben aufgrund kardialer Dekompensation. Ihre Herzen zeigen eine massive Vergrößerung und Ausweitung aller vier Kammern, ohne Anzeichen von Myozyten-Nekrose, Fibrose oder Störung der Myofibrillen-Anordnung (D'ANGELO et al. 1997). Eine Arbeitsgruppe um SAKATA erzeugte z. B. durch die chirurgische Konstruktion der Aorta gezielt eine linksventrikuläre Drucküberlastung; dabei konnte gezeigt werden, dass transgene Tiere mit nur geringgradig erhöhtem $G\alpha_q$ -Level im Myokard ebenso wie Wildtyp-Tiere eine kompensierte konzentrische Hypertrophie entwickeln. Der gleiche Versuch wurde anschließend mit transgenen Tieren, die wesentlich höhere Mengen des $G\alpha_q$ -Proteins in den Kardiomyozyten exprimieren, durchgeführt. Obwohl diese Tiere vor der Operation mit der Kontrollgruppe vergleichbare Gewichte der beiden Ventrikel aufwiesen, zeigten sie durch die zusätzliche Drucküberlastung nach drei Wochen eine dekompensierte exzentrische Kardiomyopathie (SAKATA et al. 1998).

$G\alpha_{q/11}$ und Apoptose

Versuche an isolierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten gaben eine Erklärung für den ungewöhnlich schnellen Übergang von einer initialen Hypertrophie zur Dekompensation durch die myokardialen Überexpression des $G\alpha_q$ -Proteins: Sie zeigten, dass eine konstitutiv aktivierte Form des $G\alpha_q$ -Proteins nur vorübergehend eine Hypertrophie, letztendlich aber die Apoptose der einzelnen Zellen bewirkt (ADAMS et al. 1998). Neben einer Erhöhung der Phospholipase C waren in diesen Zellen erhöhte Spiegel an c-Jun NH₂-terminal Kinase (JNK) und p38 MAP-Kinase messbar. Diese beiden Enzyme gehören zur Gruppe der so genannten Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen (MAP-Kinasen), einer Familie von Serin/Threonin-Kinasen, die im Körper weitverbreitet sind und vor allem zur Weiterleitung extrazellulärer Signale bezüglich des Zellwachstums, der Zellteilung und -differenzierung, aber auch bezüglich der Apoptose dienen (LUTRELL 2002). ADAMS et al. (1998) stellten die Vermutung auf, dass die erhöhte Aktivierung dieser beiden MAP-Kinasen die Apoptose einleiten könnte. Ein weiterer Ansatzpunkt, durch den der $G\alpha_q$ -Protein-Signalweg Einfluss auf den Zellzyklus nehmen könnte, ist die Serin/Threonin-Proteinkinase Akt. Dieses Enzym, das seinerseits durch Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI₃K) aktiviert wird, hat eine Apoptose-hemmende Wirkung (FUJIO et al. 2000; MATSUI et al. 2001; HOWES et al. 2003; UCHIYAMA et al. 2004). Der $G\alpha_{q/11}$ -Protein-Signalweg scheint die Aktivierung dieses anti-apoptotischen Proteins zu verhindern. Dabei bewirkt eine Erhöhung des $G\alpha_q$ -Proteins im Kardiomyozyten allein keine verminderte Akt-Phosphorylierung. Exprimieren hingegen Herzmuskelzellen eine konstitutiv aktivierte Mutante der $G\alpha_q$ -Untereinheit, G_qQ209L , verringert sich die Rate der Akt-Phospho-

rylierung deutlich. Auch durch bestimmte Zytokine, die in Wildtyp-Kardiomyozyten eine Steigerung der Akt-Aktivierung bewirken, wie z. B. den sogenannten Leukämie-inhibierenden-Faktor (LIF), kann in Anwesenheit diese G_qQ209L-Untereinheit keine zunehmende Phosphorylierung der Proteinkinase Akt erreicht werden. Erst eine gleichzeitig mit diesem G_qQ209L exprimierte ebenfalls konstitutiv aktivierte Mutante von Akt, myr-Akt, ist in der Lage, bestimmte Apoptoseindizes wie fragmentierte Zellkerne oder Störung der Myofilament-Anordnung im Vergleich zu Zellen mit G_qQ209L ohne myr-Akt deutlich zu verringern. Dies bedeutet, dass eine vermehrte G α_q -Aktivierung, nicht aber ein vermehrter G α_q -Spiegel allein, die Phosphorylierung von Akt inhibiert, und dass die Aktivierung der Proteinkinase Akt tatsächlich ein wichtiges Signal für das Überleben der Zelle darstellt (HOWES et al. 2003). BALLOU et al. (2003) konnten in einer Studie an kultivierten Ratten Fibroblasten ebenfalls zeigen, dass eine in Kontrollzellen durch Insulin und Platelet-derived-growth-factor (PDGF) deutliche Zunahme der Akt-Phosphorylierung durch konstitutiv aktiviertes G α_q verhindert wird. Wie auch HOWES et al. (2003) stellten sie in diesem Zusammenhang fest, dass durch die G α_q -Aktivierung die absolute Menge an Akt in der Zelle nicht verringert wird, sondern lediglich der Anteil der phosphorylierten Form. Durch weiterführende Versuche kamen sie zu dem Ergebnis, dass die Ursache dafür die direkte Inhibierung der PI₃K-Aktivität, dem Enzym, das für die Phosphorylierung von Akt notwendig ist, durch aktiviertes G α_q ist. Diese Inhibierung geschieht jedoch ihrer Meinung nach unabhängig von einer Aktivierung der PLC- β (BALLOU et al. 2003). Durch diese Ergebnisse widersprechen sie der Hypothese von HOWES et al. (2003): Sie kommen in ihrer Studie zu dem Schluss, dass ein verminderter PIP₂-Level aufgrund der verstärkten PLC- β - Aktivität die Ursache für eine verminderte Akt-Aktivierung darstellt. PIP₂ ist ein essentielles Substrat der PI₃K zur Aktivierung von Akt, aber auch ein Substrat der durch G α_q aktivierten PLC- β .

2.7 Die Maus als Tiermodell für myokardiale Ischämie und Reperfusion

2.7.1 Vor- und Nachteile gegenüber anderen Tierarten

Die ersten Versuche zur Erzeugung einer myokardialen Ischämie wurden vor allem an Hunden durchgeführt (JENNINGS et al. 1960; SCHAPER et al. 1971; FISHBEIN et al. 1981). Später erlangte das Schwein größere Bedeutung, aber auch an Kaninchen und Ratten wurden und werden solche Experimente unternommen (HARKEN et al. 1981; SHARMA et al. 1992; MIKI et al. 1998; VERDOUW et al. 1998; YTREHUS 2000). Dabei besteht ein deutlicher Unterschied zwischen den Tierarten bezüglich des Auftretens von Kollateralgefäßen, welche zumindest in einem Teil des distal der Arterienokklusion liegenden Gewebes die Blutversor-

gung aufrecht erhalten können. So zeigen Hunde eine relativ gute Versorgung durch Kollaterale; auch bei Kaninchen wird dies beobachtet, wobei allerdings intra-spezies-spezifisch Unterschiede existieren. Die Blutversorgung durch solche Gefäße bei Meerschweinchen ist so extensiv, dass diese Tiere trotz Okklusion einer Koronararterie keinen Infarkt entwickeln. Schweine, Ratten und Mäuse hingegen besitzen eine schlecht ausgeprägte Kollateralversorgung am Herzen (HARKEN et al. 1981; VERDOUW et al. 1998). Ein großer Nachteil des Maus-Modells, vor allem gegenüber den großen Tierarten wie Hund und Schwein, ist sicher darin zu sehen, dass die Versuche nicht nur mikrochirurgisches Geschick des Operators, sondern auch eine sehr spezielle und aufwendige Ausrüstung erfordern (MICHAEL et al. 1995; SALTO-TELLEZ et al. 2004). Ein deutlicher Vorteil der Maus als Versuchstier dagegen ist, dass der Aufwand für Zucht und Haltung geringer ist als für die anderen Tierarten. Vor allem aber hat das Maus-Modell einen entscheidenden Vorteil: Nicht nur, dass durch die verschiedenen Inzuchtlinien ein weites Feld an verschiedenen, genetisch identischen Tieren zur Verfügung steht – die gezielte Einschleusung oder Zerstörung bestimmter Gene, das heißt die Schaffung von transgenen Tieren und Knockout-Mäusen macht es möglich, die Beteiligung verschiedener, genau definierter Moleküle an bestimmten physiologischen und pathologischen Prozessen im Organismus zu erforschen (MICHEAL et al. 1995; LIN et al. 1995; PAIGEN 1995; PATTEN et al. 1998; VERDOUW et al. 1998; SALTO-TELLEZ et al. 2004).

2.7.2 Blutversorgung des linken Ventrikels: Vergleich Mensch – Maus

Prinzipiell sind die Herzen der Säugetiere anatomisch miteinander gut vergleichbar. Die Koronargefäße entspringen aus dem Sinus aortae. In ihrem genauen Verlauf, ihrer Aufteilung und Versorgungsgebiete zeigen sie allerdings einige spezie-spezifische Unterschiede (SCHUMMER 1984).

Koronargefäße des Menschen

Die linke Koronararterie des Menschen teilt sich kurz nach ihrem Ursprung in einen Ramus circumflexus (= left circumflex coronary artery, LCX) und einen Ramus interventricularis anterior (= left anterior descending coronary artery, LAD). Letzterer zieht im gleichnamigen Sulcus bis an die Herzspitze. Er versorgt die tiefen Muskelschichten beider Ventrikel, die Papillarmuskeln und apikale Anteile des Septums. Der im Sulcus coronarius verlaufende Ramus circumflexus versorgt den linken Vorhof und Teile des Ventrikels (McALPINE 1975; TÖNDURI 1981). Allerdings zeigen sich bei der Blutversorgung des linken Ventrikels beim Menschen individuelle Unterschiede: Am häufigsten (85 %) findet man den so genannten rechtskoronaren Versorgungs-Typ, bei dem der Ramus interventricularis posterior aus der

rechten Koronararterie an der linksventrikulären Versorgung beteiligt ist. Beim linkskoronaren Versorgungs-Typ (8 %) entspringt dieser Ramus interventricularis posterior aus dem Ramus circumflexus, im Fall des ausgeglichenen Versorgungs-Typ geben sowohl die Arteria coronaria dextra als auch der Ramus circumflexus einen Ramus interventricularis posterior ab (RIEDE und DREXLER 1999). Außer der klassischen Bifurkation der linken Koronararterie in den Ramus interventricularis anterior und einen Ramus circumflexus tritt etwas weniger häufig eine Trifurkation auf: Hierbei zweigt zusätzlich ein sogenannter Ramus diagonalis ab. Bei einem noch geringeren Anteil existieren zwei Rami diagonales (I und II), in diesen Fällen liegt damit eine Quadrifurkation vor (BAPTISTA et al. 1991).

Koronargefäße der Maus

Bei der Maus verläuft die linke Koronararterie an der linken Fläche des Herzens apikal, gibt hierbei bis zu vier Äste ab und versorgt den linken Ventrikel. Die rechte Koronararterie hingegen teilt sich kurz nach ihrem Ursprung in einen an der rechten Oberfläche verlaufenden Ast zur Versorgung des rechten Ventrikels und einen septalen Ast. Bei einem Großteil der Tiere wird allerdings die Herzspitze allein von der linken Koronararterie, bei kleineren Teilen der Population entweder von dem rechten Koronargefäß oder von beiden versorgt. Im Gegensatz zum Menschen existiert ein eigener Ast zur Versorgung des Septums, weshalb man die Arteria coronaria sinistra der Maus, die oftmals entsprechender der des Menschen left anterior descending coronary artery (LAD) genannt wird, nicht funktionell mit der des Menschen gleichsetzen kann; die LAD des menschlichen Herzens ist zusätzlich für die Versorgung des Septums zuständig, da kein eigener Ast hierfür existiert (ICARDO und COLVEE 2001; SALTO-TELLEZ et al. 2004). MICHEAL et al. (1995) zeigen in ihrem Artikel verschiedene Aufteilungsmuster der murinen Arteria coronaria sinistra und beschreiben einen, wenngleich rudimentären, dennoch regelmäßig bei einem Großteil der Mäuse auftretenden Ramus circumflexus aus der linken Koronararterie. Auch SALTO-TELLEZ et al. (2004) zeigen in ihrer Untersuchung speziell an Mäusen des Stammes C57BL/6, dass diese Aufteilung der linken Koronararterie entsprechend der Verhältnisse beim menschlichen Herz regelmäßig auftritt. Zudem stellen sie fest, dass der Ast zur Versorgung des Septums zwar in den meisten Fällen (55 %) aus der rechten, in den restlichen Fällen jedoch entweder aus der linken oder jeweils aus linker und rechter Arteria coronaria gemeinsam entspringt. In einem Artikel von AHN et al. (2004), die das an der linken Herzseite apikal verlaufende prominente Gefäß als Left Main Descending Artery (LMDA) bezeichnen, sind verschiedene Verzweigungsmuster dieser LMDA ebenfalls für die C57BL/6-Maus aufgeführt.

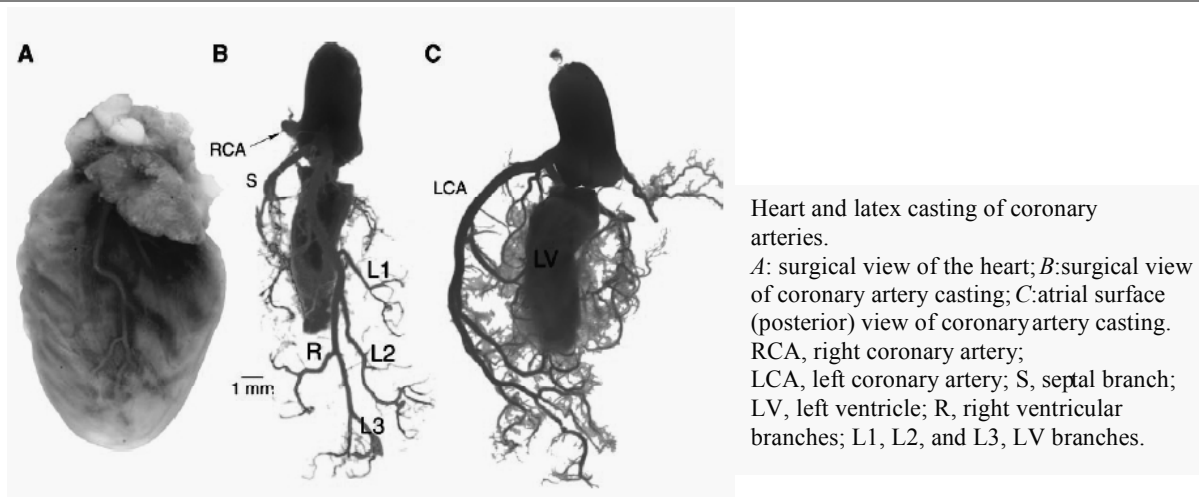


Abb. 5: Herz und Ausgusspräparate der Koronargefäße einer C57BL/6-Maus (AHN et al. 2004)

Wie bereits erwähnt, besteht aufgrund der schlechten Kollateralversorgung des Mäuseherzens in jedem Fall die Möglichkeit, operativ durch eine Ligatur eines Astes dieser Arteria coronaria sinistra eine myokardiale Ischämie und als Folge daraus einen Infarkt herbeizuführen (MICHEAL et al. 1995; AHN et al. 2004; SALTO-TELLEZ et al. 2004).

2.7.3 Thrombozyten: Vergleich Mensch - Maus

Die Thrombozyten der Maus unterscheiden sich in einigen Parametern von denen des Menschen (vgl. Tab. 4). Ihre Form ist kleiner und langgestreckter; während humane Blutplättchen einen Durchmesser von etwa 1 bis 2 μm haben, beträgt der der murinen 0,5 μm . Demzufolge ist auch das Zellvolumen kleiner: 8 bis 9 fl beim Menschen, 3 bis 4 fl dagegen bei der Maus (SCHMITT et al. 2001). Die α -Granula sind in murinen Thrombozyten heterogener bezüglich der Größe und der Form, die dichten Granula in etwas geringerem Umfang als beim Menschen enthalten. Die Lebensspanne beträgt für humane Blutplättchen circa 8 bis 12 Tage, für murine 3 bis 5 Tage (BAKER et al. 1997; MANNING und McDONALD 1997; SCHMITT et al. 2001). Allerdings besitzen Mäuse eine erheblich größere Menge reifer Thrombozyten: 1000 bis 1500 $\times 10^9$, der Mensch verfügt über 150 bis 400 $\times 10^9$ Thrombozyten pro Liter Blut. Auch die Anzahl der Megakaryozyten ist bei Mäusen höher; wie auch die Thrombozyten, sind die murinen Vorläufer der Blutplättchen kleiner als die des Menschen. Während die humanen Megakaryozyten in physiologischem Zustand nur im Knochenmark nachweisbar sind, lassen sie sich bei Mäusen regelmäßig auch in der roten Milzpulpa nachweisen; des Weiteren ist die Megakaryozyten-Dichte im Knochenmark bei Mäusen deutlich höher als beim Menschen (SCHMITT et al. 2001).

In Bezug auf die Expression und Funktion der G-Proteine eignen sich Mäuse gut als Modell

Tab. 4: Vergleich von humanen und murinen Thrombozyten und Megakaryozyten anhand verschiedener Parameter nach SCHMITT et al. (2001)

Parameter	Mensch	Maus
Thrombozyten		
Anzahl im Blut ($\times 10^9/l$)	150-400	1000-1500
Durchmesser (μm)	1-2	0,5
Volumen (fl)	8-9	3-4
Lebensdauer (Tage)	8-12	3-4
α -Granula (pro Thrombozytenanschnitt)	5-6	3-4
dichte Granula (pro Thrombozytenanschnitt)	1	0,5
Megakaryozyten		
Durchmesser (μm)	30-60	20-30
Anzahl im Knochenmark (pro mm^2)	7-11	20

für den Menschen: Bei den heterotrimeren G-Proteinen handelt es sich um eine in der Evolution hochkonservierte Genfamilie; nicht nur verschiedene Säugetierspezies zeigen eine große Übereinstimmung bezüglich der Expression der verschiedenen G-Protein-Familien, auch in Invertebraten lassen sich die vier Familien nachweisen (WILKIE et al. 1992).

Während das murine Gen für $G\alpha_q$ sich nur minimal vom humanen unterscheidet, existieren für die $G\alpha_{11}$ -Untereinheit deutlichere Spezies-spezifische Variationen. Mit speziellen Primern konnte das Fehlen von $G\alpha_{11}$ -Proteinen sowohl in Thrombozyten der Maus als auch in denen des Menschen nachgewiesen werden (JONSOHN et al. 1996).

2.8 Bestrahlung und Knochenmarktransplantation am Mausmodell

2.8.1 Hämatopoetische Stammzellen der Maus

Hämatopoetische Stammzellen haben sowohl die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern, als auch, sich in jede der verschiedenen Blutzell-Linien zu differenzieren. Damit sind sie die ersten und einzigen „Ursprungszellen“ der Hämatopoese; nach einer gewissen Anzahl von Teilungen zur Selbsterneuerung differenzieren sie sich in eine bestimmte Zelllinie und werden nach weiteren Teilungen zu Vorläuferzellen der letztendlich reifen Erythrozyten, Megakaryozyten bzw. Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen und der verschiedenen Lymphozyten. Durch Selektion nach der Expression bestimmter Oberflächenantigene lässt sich aus dem Knochenmark von Mäusen eine heterogene Zellpopulation isolieren (so genann-

te Thy 1,1^{lo} Lin⁻ Sca-1⁺-Zellen), die mit diesen Stammzellen angereichert ist. Diese Zellpopulation beinhaltet etwa 0,02 bis 0,05 % der Gesamtzellen des Knochenmarks (SPANGRUDE et al. 1988; SMITH et al. 1991; UCHIDA et al. 1993; SLAYTON et al. 2002). 30 solcher Zellen zeigten sich in der Studie von SPANGRUDE et al. (1988) ausreichend, um 50 % einer Gruppe letal bestrahlter Mäuse überleben zu lassen. In dieser Zellpopulation kann man weiterhin zwischen Zellen, deren Mitochondrien sich stark mit Rhodamin 123 anfärben lassen (Rho^{high}), und solchen, die nur eine geringe Färbung annehmen (Rho^{low}) unterscheiden. Während die Rho^{high}-Zellen im Falle einer Knochenmarktransplantation für eine kurzfristige gesteigerte Hämatopoese, vor allem eine Erythropoese, sorgen, stellen die Rho^{low}-Zellen die Grundlage für eine langfristige Hämatopoese im Empfängertier dar (UCHIDA et al. 1993; SLAYTON et al. 2002).

2.8.2 Bestrahlungs- und Transplantationsregime

Für die erfolgreiche Rekonstitution des Empfängertieres mit Knochenmarkzellen des Spenders sind außer der absoluten Strahlendosis die Dosisrate, die Anzahl der transplantierten Zellen und der Zeitraum zwischen Bestrahlung und Transplantation von Bedeutung.

Strahlendosis

Prinzipiell zeigen die einzelnen Mäuse-Zuchtlinien unterschiedlich stark ausgeprägte Resistenz gegenüber radioaktiver Strahlung. Besonders sensibel im Vergleich zu anderen Linien zeigten sich in Versuchen sowohl gegenüber langfristiger, geringer dosierter Strahlung als auch gegenüber kurzer, hochdosierter Exposition Mäuse des Zuchtstammes BALB/cJ, besonders resistent hingegen erwiesen sich solche der Linien SJL/J und 129/J. Im Mittelfeld sind z. B. RF7/J-Mäuse sowie Tiere des Stammes C57BL/6J zu finden (RODERICK 1963; YUHAS und STORER 1969; CUI et al. 2002). Um zu erreichen, dass die Hämatopoese der Empfängertiere nach der Knochenmarktransplantation (nahezu) ausschließlich durch Stammzellen der Spendertiere geschieht und somit eine vollständige Rekonstitution vorliegt, muss durch die Bestrahlung für diese transplantierten Zellen Platz geschaffen werden (DOWN et al. 1991; TOMITA et al. 1994; MILLER 2002). So zeigen Empfängertiere, die keiner oder nur sehr geringer (0,5 Gy) Strahlung ausgesetzt waren, zwar kurz nach einer Transplantation von syngenen Knochenmark einen Blutzell-Chimärismus, welcher allerdings innerhalb von 20 Wochen verschwindet. Mit einer Bestrahlung von 1,5 Gy kann zumindest bei einem Teil der Tiere ein stabilerer Chimärismus erzeugt werden. Bei einem Wert zwischen 1,5 und 3 Gy zeigen 100 % der bestrahlten Tiere einen stabilen Anteil von Spender-Blutzellen bis zu 80 % (TOMITA et al. 1994). DOWN et al. (1991) bewiesen ebenfalls, dass bei einer Dosis von

2 Gy durch eine Transplantation von 10^7 syngen Knochenmarks-Zellen ein Blutzellchimerismus im Empfängertier erreicht wird. Für eine allogene Transplantation ist allerdings ein Wert von mindestens 5,5 Gy nötig. Ab 7 Gy konnte in diesen Versuchen an C57BL/6-Mäusen als Empfängertiere eine Rekonstitution von 100 % erreicht werden (DOWN et al. 1991). Um bei höheren Strahlendosen die Toxizität möglichst gering zu halten, kann die Bestrahlung fraktioniert durchgeführt werden. Zum Beispiel lässt sich eine Gesamtdosis von 12 Gy, die als Einzeldosis tödlich ist, auf zwei Dosen von jeweils 6 Gy aufteilen. Während bei Intervallen von 1 bis 2 Stunden zwischen diesen Einzeldosen noch deutliche Nebenwirkungen wie z. B. die Ausbildung eines Kataraktes beobachtet werden, treten solche bei längeren Abständen zwischen den Bestrahlungen nicht auf. Als optimales Zeitintervall zwischen zwei Einzeldosen einer fraktionierten Bestrahlung erwies sich für eine allogene Knochenmarktransplantation eine Dauer von vier Stunden. Eine längere Zeitspanne kann dazu führen, dass sich einige Stammzellen des Empfängertieres erholen und nicht vollständig durch die des Spendertieres ersetzt werden (CUI et al. 2002). Diese Studie von CUI et al. (2002) kommt zu dem Ergebnis, dass eine fraktionierte Bestrahlung der Empfängertiere von 2 mal 6 Gy die beste Voraussetzung für eine vollständige Rekonstitution nach einer allogenen Knochenmarktransplantation liefert. Dennoch zeigen sich auch letale Einzeldosen von 9,5 Gy als ausreichend, solch eine stabile Rekonstitution zu erhalten, wenngleich die Überlebensrate tendenziell geringer ist. Es konnte für diese Einzeldosis von 9,5 Gy außerdem nachgewiesen werden, dass sich in Tieren, die damit bestrahlt wurden, aber kein Knochenmark transplantiert bekamen, keine Koloniebildenden-Einheiten mehr entwickeln; damit gilt diese Einzeldosis als ausreichend, um die Stammzellen des Empfängers vollständig abzutöten (DOWN et al. 1991; CUI et al. 2002; ASKENASY et al. 2003).

Dosisrate

Für eine erfolgreiche Rekonstitution ist allerdings nicht nur die absolute Dosis ausschlaggebend, auch die Dosisrate muss dabei berücksichtigt werden. So ist eine Rate von 0,1 Gy/min bei einer Einzeldosis von 8 Gy nicht ausreichend, um eine Einnistung von Donor-Stammzellen im Empfängertier zu erreichen. Erhöht man diese bei gleicher Absolut-Dosis auf 0,7 Gy/min, erreicht man acht Wochen nach Transplantation einen Anteil von Donor-Blutzellen von etwa 55 %. Eine weitere Steigerung der Dosisrate bis zu 1,3 Gy/min zeigt deutlich bessere Ergebnisse bezüglich der Rekonstitution. Allerdings ist die Letalität dadurch ebenfalls erhöht. In den meisten Studien wird als Kompromiss daraus eine Dosisrate von etwa 1 Gy/min verwendet (SALOMON et al. 1990; DOWN et al. 1991; CUI et al. 2002).

Anzahl an transplantierten Zellen

Wie zuvor beschrieben, soll eine Zahl von 30 Thy 1,1^{lo} Lin⁻ Sca-1⁺-Zellen ausreichen, um 50 % einer Gruppe letal bestrahlter Mäuse überleben zu lassen. Diese Stammzellpopulation macht 0,02 bis 0,05 % der gesamten Knochenmarkszellen aus (SPANGRUDE et al. 1988; SMITH et al. 1991; UCHIDA et al. 1993; SLAYTON et al. 2002). Allerdings erreicht man je nach Anzahl der transplantierten Zellen bei gleichbleibender Dosis und Dosisrate eine mehr oder weniger gute Rekonstitution im Empfängertier. Dafür wird eine bestimmte Anzahl unselektierter Knochenmarkszellen aus dem Knochenmark des Spendertieres transplantiert oder spezielle Stammzellen werden zuvor isoliert und nur diese gezielt transplantiert. Nach UCHIDA et al. (1994) entsprechen dabei 500 Thy 1,1^{lo} Lin⁻ Sca-1⁺-Zellen etwa 1×10^6 unselektierten Knochenmarkszellen. Für eine Transplantation ohne vorhergehende Stammzellisolation werden den Empfängertieren zwischen 2×10^6 und $1,5 \times 10^7$ Knochenmarkszellen des Spenders injiziert (ADLER 1984; SKORSKI et al. 1988; SALOMON et al. 1990; DOWN et al. 1991; TOMITA et al. 1994; UCHIDA et al. 1994; CUI et al. 1999; PETRY et al. 2001; CUI et al. 2002). Eine Studie arbeitet gezielt mit geringeren Mengen (5×10^4 bis 1×10^6) bei letaler Bestrahlung der Empfängertiere. Dabei zeigt sich, dass die Menge an transplantierten Zellen einen limitierenden Faktor für das Überleben der Tiere darstellt. Je höher die Zellzahl, desto höher ist der Anteil der überlebenden Tiere (WEISS et al. 1988). Allerdings scheint es keinen bestimmten Schwellenwert zu geben, ab dem die Anzahl der transplantierten Zellen für eine Knochenmarktransplantation ausreichend ist und eine Erhöhung keinen Effekt mehr zeigen würde. Vielmehr kann durch eine größere Menge bei gleicher Strahlendosis und Dosisrate eine verbesserte Rekonstitution erreicht werden. So postulieren zum Beispiel CUI et al. (2002) in ihrer Studie über ein optimales Bestrahlungsregime, dass die fraktionierte Bestrahlung der Einzeldosis überlegen ist. Diese Untersuchung wurde mit einer Menge von 3×10^6 Zellen durchgeführt. Der gleiche Versuch mit 1×10^7 Zellen ergab für die Einzeldosis jedoch ebenso wie für die fraktionierte Bestrahlung eine optimale Rekonstitution bei einer Letalität von 0 % (CUI et al. 2002). Mit einer höheren Anzahl an transplantierten Zellen kann man folglich die Dosis oder die Dosisrate erniedrigen, um denselben Effekt zu erhalten. Damit wird deutlich, dass bei einer Knochenmarktransplantation mit vorausgehender Bestrahlung des Empfängertieres eine deutliche Abhängigkeit zwischen den drei Größen absolute Dosis, Dosisrate und Anzahl der transplantierten Zellen besteht (SALOMON et al. 1990; DOWN et al. 1991; CUI et al. 2002).

Zeitintervall zwischen Bestrahlung und Transplantation

Auch die Zeitspanne zwischen der Bestrahlung und der Applikation des Spender-Knochenmarks hat einen Einfluss auf den Erfolg der Transplantation. So zeigt sich, falls man eine limitierende Anzahl von Zellen transplantiert, die Überlebensrate abhängig vom Zeitintervall zwischen Bestrahlung und Transplantation. Dabei scheint eine Spanne von 24 Stunden optimal für eine erfolgreiche Einpflanzung des Spender-Knochenmarkes (WEISS 1988).

Entscheidend ist jedoch vor allem, dass die Transplantation nicht unmittelbar nach der Bestrahlung stattfindet (WEISS 1988). Es genügt allerdings eine Zeitspanne von sechs Stunden zwischen Bestrahlung und Transplantation, um eine vollständige Rekonstitution zu erreichen, sofern eine ausreichende Strahlen-Dosis und Menge an transplantierten Zellen verwendet werden (DOWN et al. 1991; UCHIDA et al. 1994; PETRY et al. 2001; ASKENASY et al. 2003).

2.8.3 Hämatopoese im Empfängertier in der Zeit nach der Transplantation

In den ersten Wochen nach einer Knochenmarktransplantation ist vorwiegend eine Erholung der erythroiden und der granulozytären Zelllinie zu beobachten. Vor allem in der Milz, die durch die Transplantation erst zu einer Hämatopoese, die vom Knochenmark unabhängig ist, befähigt wird, findet sogar eine stark überschießende Produktion von Granulozyten und deren Vorläuferzellen statt. Die Produktion der lymphozytären Linie hingegen scheint verzögert einzusetzen und vor allem durch das Knochenmark, nicht durch die Milz in Gang gesetzt zu werden (ADLER 1984; MILLER 2002). Speziell die Thrombozyten erreichen spätestens 90 Tage nach einer Transplantation wieder normale Blutlevel. Der Megakaryozyten-Spiegel erreicht hingegen bis 270 Tage nach einer Transplantation von 1000 Thy 1,1^{lo} Lin⁻ Sca-1⁺-Zellen keine Normalwerte mehr, die Antwort auf bestimmte Thrombozytose-induzierende Stimuli ist bei solchen Tieren vermindert (BRADFORD et al. 1993). SKORSKI et al. (1988) beispielsweise transplantierten 10⁷ unselektierte Knochenmarkszellen und erreichten normale Thrombozytenzahlen bereits 56 Tage nach Transplantation.

2.9 Der Einfluss von Gα_q-Protein-Knockout auf die Infarktgröße

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, muss man davon ausgehen, dass eine Aktivierung der Thrombozyten zum Ischämie/Reperfusionsschaden beiträgt. Da Thrombozyten nur Gα_q, nicht aber Gα₁₁ exprimieren (JOHNSON et al. 1996), ist ihre Aktivierung bei Fehlen oder Blockade des Gα_q-Proteins gestört. Gα_q-Knockout-Tiere zeigen deshalb nicht nur eine verzögerte Blutgerinnung, sondern auch eine wesentlich geringere Thromboseneigung (OFFERMANN et al. 1997b).

Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob $G\alpha_q$ -Knockout-Tiere wegen ihrer gestörten Thrombozytenaktivierung auf eine myokardiale Ischämie mit anschließender Reperfusion weniger empfindlich reagieren als gesunde Tiere.

Um dies herauszufinden, ist bereits eine Studie durchgeführt worden (HEUER, in Vorbereitung). Dabei wurden Wildtyp- sowie $G\alpha_q$ -Knockout-Tiere einer 30-minütigen myokardialen Ischämie und einer anschließenden 24-stündigen Reperfusionsphase unterzogen. Anschließend wurde ex vivo die Größe der daraus resultierenden Myokardinfarkte planimetrisch bestimmt. Diese Untersuchungen ergaben, dass die Mäuse, denen das $G\alpha_q$ -Protein fehlte, nach einer Ischämie/Reperfusion signifikant kleinere Infarkte als die Mäuse ohne Gendefekt entwickelten (HEUER, in Vorbereitung, vgl. Tab. 5).

Tab. 5: Ergebnisse für die Infarktgrößen - Angaben in % (HEUER, in Vorbereitung)

Gruppe	Wildtyp		Knockout	
	MW	SEM	MW	SEM
Infarkt zu area at risk I/AAR	26	3,1	6	1,9
Infarkt zu linkem Ventrikel I/LV	17,6	2,8	4,1	1,2

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielsetzungen

Auf dem Ergebnis, dass Mäuse mit defektem $G\alpha_q$ -Protein gegenüber einer myokardialen Ischämie/Reperfusion eine deutlich geringere Empfindlichkeit als Wildtyp-Tiere zeigen (HEUER, in Vorbereitung, vgl. Kap. 2.9), basiert die vorliegende Arbeit. Es ist zwar erwiesen, dass in den Thrombozyten nur $G\alpha_q$, nicht $G\alpha_{11}$ exprimiert wird, aber es ist bisher nicht bekannt, welche Rolle $G\alpha_q$ beispielsweise in den Kardiomyozyten spielt, in denen es zusammen mit $G\alpha_{11}$ auftritt, bzw. inwieweit $G\alpha_{11}$ das fehlende $G\alpha_q$ vollständig ersetzen kann.

Deshalb bleibt nach der vorangegangenen Untersuchung von HEUER (in Vorbereitung) unklar, ob die Ursache für die geringere Empfindlichkeit der Knockout-Tiere gegenüber einer Ischämie mit anschließender Reperfusion auf die Störung der Thrombozyten zurückzuführen ist oder aber auf unbekannten Effekten durch das fehlende Signalprotein zum Beispiel in den Kardiomyozyten beruht.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, sollen in der vorliegenden Studie die Auswirkungen einer myokardialen Ischämie/Reperfusion an Tieren untersucht werden, die einen Chimärismus bezüglich des $G\alpha_q$ -Knockout-Defekts in ihren Blutzellen und den übrigen Körperzellen aufweisen. Um einen solchen Chimärismus zu erreichen, soll im Vorfeld der Untersuchung eine Knochenmarktransplantation durchgeführt werden. Dabei erhalten Wildtyp-Tiere Knochenmark – und damit Thrombozyten – von $G\alpha_q$ -Knockout-Tieren, während Mäusen, denen $G\alpha_q$ im gesamten Körper fehlt, Blut-Stammzellen der Wildtyp-Tiere mit erhaltener $G\alpha_q$ -Funktion transplantiert werden. Diese chimären Tiere, die entweder Wildtyp-Blutzellen und $G\alpha_q$ -deletierte Körperzellen, oder aber $G\alpha_q$ -deletierte Blutzellen und Wildtyp-Körperzellen besitzen, sollen den gleichen Bedingungen wie die nicht-transplantierten Tiere der Untersuchung von HEUER (in Vorbereitung) bezüglich der Ischämie und Reperfusion ausgesetzt werden.

Die aus der Ischämie/Reperfusion entstehenden Infarktgrößen der transplantierten Tiere der vorliegenden Studie sollen, indem man sie mit den Ergebnissen der Untersuchung von an den nicht-transplantierten Tieren von HEUER (in Vorbereitung) vergleicht, Aufschluss darüber geben, ob eine gestörte Thrombozyten-Aktivierung tatsächlich die Ursache für die geringere Empfindlichkeit der $G\alpha_q$ -Knockout-Mäuse gegenüber einer myokardialen Ischämie und Reperfusion darstellt.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere dienen $G\alpha_q$ -Knockout-Mäuse und Mäuse der gleichen Kreuzung ohne Gendefekt. Die Deletion des $G\alpha_q$ -Gens wurde von OFFERMANN et al. (1997a) an embryonalen Zellen von Mäusen des Stammes 129/Sv durchgeführt. Durch Kreuzung der herangewachsenen Tiere mit Mäusen des Stammes C57BL/6 gelang es, eine Zucht von $G\alpha_q$ -Knockout-Tieren mit dem genetischen Hintergrund 129/Sv und C57BL/6 zu ermöglichen. Von diesen Tieren wurde der eigenen Arbeitsgruppe freundlicherweise von OFFERMANN jeweils ein Wildtyp- und ein Knockout-Zuchtpärchen überlassen, mit denen die Zucht im Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München weitergeführt werden konnte.

Die Mäuse werden in Gruppen bis zu sechs Tieren in Makrolonkäfigen gehalten. Dabei herrschen Raumtemperaturen zwischen 20°C und 23°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % bis 60 %. Die Einstreu der Käfige besteht aus entstaubtem und entkeimtem Weichholzgranulat (Faser, Fa. Altromin, Lage, D). Wasser und Futter (autoklaviertes Mäusefutter, Fa. Altromin, Lage, D) steht den Tieren immer ad libitum zu Verfügung, in den Ställen ist ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus in zwölfstündigem Intervall eingerichtet, mit einer Beleuchtungsstärke von 50 bis 100 Lux im Käfig in der Lichtphase.

Die tierexperimentelle Studie wurde gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.2.2 Genotypisierung

Für die Unterscheidung zwischen Wildtyp-Tieren, heterozygoten und homozygoten Knockout-Mäusen wird jedem einzelnen Tier ab einem Alter von vier Wochen unter Isofluran-Kurzarkose ein kleines Stück der Schwanzspitze entnommen. Mithilfe dieser Gewebeprobe wird eine Genotypisierung nach einem mündlich überlieferten Protokoll von OFFERMANN durchgeführt.

Die Aufreinigung der DNA aus der Gewebeprobe wird mithilfe des DNeasy[®] Tissue Kits (Qiagen GmbH, Hilden, D) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Anschließend werden die entsprechenden Gensequenzen durch eine PCR amplifiziert. Zuvor muss durch eine photometrische Messung bei 260 nm im DU[®] 640 Spectrophotometer (Beckmann GMBH, Fullerton, USA) die Konzentration der DNA im Elutionspuffer ermittelt werden. Die Extinktion der 1:10 mit Aqua dest. verdünnten DNA-Probe bei 260 nm multipliziert mit 500 ergibt die Konzentration an DNA im Elutionspuffer in µg/ml. 100 ng dieser DNA werden anschlie-

ßend in die PCR eingesetzt; für den PCR-Ansatz dient der Titanium™ Taq PCR Kit (BD Biosciences, Heidelberg, D).

Zu Beginn wird die Probe mit 2,50 µl 10x PCR-Puffer, 2,00 µl dNTP, 0,75 µl Primer Mix (QIN7A: 5'-CTG GTT AGG AGC TCA GCT CTG AAG-3', QNEO: 5'-TTC AAA GTA TCA CAC TCA CAT CAC AG-3', TW37: 5'-TGC CTG CTT GCC GAA TAT CAT GG-3'; angefertigt von MWG Biotech, Ebersberg, D) und Aqua dest. ad 25 µl sowie 0,2 µl Taq-Polymerase in einem Thermocycler (Mastercycler® gradient Fa. Eppendorf, Hamburg, D) 3 min bei 94°C zur Auftrennung der DNA-Stränge inkubiert. Anschließend folgen 30 Zyklen aus jeweils folgenden drei Schritten:

- 30 s bei 94 °C,
- 1 min bei 63,5 °C
- 1 min bei 72 °C

Nach diesen 30 Zyklen erfolgt eine abschließende Inkubation für 10 min bei 72 °C. Die amplifizierten DNA-Fragmente werden in einem 1%-igem Agarosegel, dem Ethidiumbromid zur Anfärbung der Nukleotidstränge beigelegt wird, bei einer Spannung von 40 V in der Elektrophoresekammer (eigene Herstellung) aufgetrennt. Zur Verifizierung der Fragment-Größen wird pro Ansatz neben einer Positiv- und Negativ-Kontrolle eine Tasche des Gels mit Größen-definierten DNA-Fragmenten (je 1 µl 100 bp-Marker New England Biolabs GmbH, Frankfurt-Höchst, D) gefüllt. Nach drei bis vier Stunden kann das Ergebnis unter einem UV-Tisch (MWG Biotech, Ebersberg, D) abgelesen werden:

- Banden bei 500 bp = Wildtyp-Allel (Primer: QIN7A/QNEO),
- Banden bei 300 bp = Knockout-Allel (Primer: TW37/QNEO).

Das bedeutet für den Genotyp des entsprechenden Tieres:

- eine Bande bei 500 bp = +/+ = Wildtyp
- eine Bande bei 300 bp = -/- = Knockout
- zwei Banden bei 500 bp und 300 bp = +/- = heterozygot

3.2.3 Versuchsablauf

In dem Versuch sollen zwei Gruppen bezüglich eines Ischämie-Schadens im Myokard verglichen werden: Wildtyp-Mäuse, denen Knochenmark von $G\alpha_q$ -Knockout-Mäusen transplantiert wird, und $G\alpha_q$ -Knockout-Mäuse, die Knochenmark von Wildtyp-Tieren erhalten (vgl. Tab. 6).

Dazu werden weibliche Mäuse ab einem Alter von acht Wochen mit γ -Strahlung bestrahlt; anschließend wird ihnen Knochenmark von männlichen Tieren der jeweils anderen Gruppe

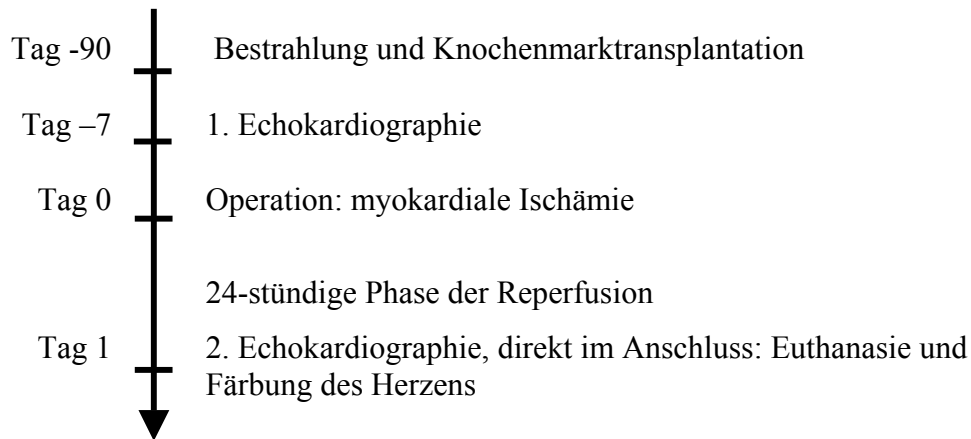


Abb. 6: Schema zum Versuchsablauf

transplantiert. Zur Messung der Rekonstitutionsrate nach der Knochenmarktransplantation dient eine PCR aus dem Blut der euthanasierten Tiere nach dem TaqMan™-Verfahren. Frühestens 12 Wochen nach der Transplantation misst man die physiologische Herzkontraktivität dieser Tiere mithilfe einer Echokardiographie. Eine Woche später erfolgt der chirurgische Eingriff, um eine 30-minütige linksventrikuläre myokardiale Ischämie herbeizuführen, an die sich eine 24-stündige Reperfusionsphase anschließt. Nach einer weiteren Ultraschalluntersuchung werden die Tiere euthanasiert (vgl. Abb. 6). Das entnommene Herz wird gefärbt und anschließend bei -80°C aufbewahrt. Zur Probenauswertung wird das Herz senkrecht zur Herzachse in sechs Scheiben geschnitten; die ersten vier Schnitte, ausgehend von der Herzspitze, werden fotografiert und gewogen. Mithilfe von Bildverarbeitungsprogrammen lassen sich anschließend am Computer die Infarktgrößen bestimmen.

Tab. 6: Übersicht: Versuchsgruppen

Versuchsgruppe	Genotyp der Tiere	Genotyp der transplantierten Knochenmarkszellen	Anzahl der Tiere pro Gruppe
WI	Wildtyp: $G\alpha_q^{(+/+)}$	Knockout: $G\alpha_q^{(-/-)}$	14
KO	Knockout: $G\alpha_q^{(-/-)}$	Wildtyp: $G\alpha_q^{(+/+)}$	11

3.2.4 Bestrahlung und Knochenmarktransplantation

Am ersten Tag werden weibliche Empfängertiere beider Gruppe im Alter von 8 bis 15 Wochen in einer Cs137-Strahlenquelle (Typ OB 29/902-1; Buchler GMBH, Braunschweig, D) mit γ -Strahlung in einer Dosis von 9,5 Gray bestrahlt. Die männlichen Spendertiere

euthanasiert man durch Genickbruch unter tiefer Isoflurannarkose, um ihnen jeweils Humerus, Femur und Tibia beider Vorder- bzw. Hintergliedmaßen zu entnehmen. Nachdem an diesen Knochen das Weichteilgewebe vollständig entfernt worden ist, kann mithilfe einer 2-ml-Spritze und einer Kanüle (27G x $\frac{3}{4}$) das Knochenmark in RPMI-Medium (GibcoTM Gaithersburg, USA), das mit 5 ml Penicillin-Streptomycin (Sigma - Aldrich Chemie, Taufkirchen, D) je 500 ml versetzt ist, gespült werden. Dieses wird anschließend durch einen Cell Strainer (Falcon, Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankreich) gegeben, um die einzelnen Zellen zu trennen, und bei 23°C fünf Minuten lang bei 1000 rpm zentrifugiert (Universal 30 RF[®], Hettlich, Tuttlingen, D). Das auf diese Weise aufbereitete Knochenmark eines Spendertieres enthält 5 bis 6×10^7 Zellen und ist damit ausreichend für zwei Empfängertiere.

Das Pellet wird anschließend in 400 µl PBS - Puffer (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o $MgCl^{2+}/CaCl^{2+}$, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, D) resuspendiert und halbiert, so dass jede Portion ein Volumen von 200 µl hat. Je eine solche Portion wird den Empfängertieren sechs Stunden nach der Bestrahlung unter Isofluran-Inhalationsnarkose über eine Schwanzvene intravenös verabreicht.

Die Einleitung der Narkose erfolgt in einer Plexiglas-Röhre (eigene Anfertigung) die als Ganzkörperkammer dient. Sobald sich die Maus darin befindet, wird über einen Verdampfer (Vapor 19.3, Abbott, Drägerwerk AG, Lübeck, D) Isofluran (Forene[®], Abbott, Ludwigshafen, D) in einer Konzentration von fünf Volumenprozent bei Zufuhr von 0,6 l/min reinem Sauerstoff über einen Durchflussmesser (Uno, Zevenaar, Holland) eingeleitet. Nach Verlust des Stellreflexes führt man die Narkose mithilfe einer Inhalationsmaske (eigene Anfertigung) bei 1,5 Volumenprozent Isofluran und demselben Sauerstoffflow fort. Um eine bessere Durchblutung des Schwanzes des Tieres herbeizuführen, wird dieser in ca. 40°C warmes Wasser eingetaucht. Mithilfe eines Gummischlauches staut man vorsichtig die venösen Gefäße am Schwanzansatz, so dass sich das aufbereitete Spender-Knochenmark in eine der Schwanzvenen mithilfe einer Insulinspritze (BD Micro-FineTM, BD Consumer Healthcare, Franklin Lakes, USA) injizieren lässt.

Um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten, findet die Operation der Tiere frühestens 90 Tage nach dieser Transplantation statt. Während dieser Ruhezeit erhalten die Mäuse zur antibiotischen Prophylaxe 20 mg Ofloxacin (Ofloxacin Pulver, Fa. Synopharm, Barsbüttel, D) pro 150 ml Wasser im Trinkwasser.

3.2.5 Bestimmung der Rekonstitutionsrate mit dem TaqManTM-Verfahren

Prinzip des TaqManTM-Verfahrens

Mit dem TaqManTM-Verfahren lässt sich in einer Probe die Menge eines bestimmten DNA-Abschnitts quantitativ bestimmen. Es handelt sich dabei um eine PCR, bei der zusätzlich ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet wird, der proportional zur Produktmenge der PCR aktiviert wird. Die Zahl der Vermehrungszyklen, die notwendig ist, bis die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übertrifft, wird als ct-Wert bezeichnet. Ein kleinerer ct-Wert bedeutet deshalb eine höhere Anfangskonzentration des gesuchten DNA-Abschnitts.

Durchführung der Rekonstitutionsmessung

Die angewandte Methode, mithilfe des Y-Chromosoms und eines „housekeeping-Gens“ die Rekonstitutionsrate von weiblichen Empfängertieren, denen Knochenmark männlicher Tiere transplantiert wurde, nachzuweisen, wurde mit anderen PCR-Verfahren bereits von PETERS et al. (2002) und MURAMATSU et al. (2003) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wird an Stelle der Verwendung von Standardkurven die Berechnungsmethode nach dem User Bulletin #2, Abi Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA) zur Bestimmung der Rekonstitutionsrate herangezogen.

Aus dem bei der Euthanasie der Tiere gewonnenen Blut wird mithilfe des E.Z.N.A.[®] Blood DNA Mini Kitt (Peqlab, Erlangen, D) eine DNA-Isolierung vorgenommen. Um eine gründlichere DNA-Elution zu erhalten, modifiziert man die Arbeitsanleitung des Herstellers insofern, als ein doppelter Waschvorgang der Säule stattfindet.

Die Menge an DNA im Eluat lässt sich anschließend durch Photometrie bei 260 nm und 280 nm im DU[®] 640 Spectrophotometer (Beckmann GMBH, Fullerton, USA) bestimmen. 100 ng der DNA werden mit TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Roche, Branchburg, New Jersey, USA) und den Primern Mm00441712_s1 Sry (Applied Biosystems, Foster City, USA) für das Y-Chromosom, sowie Mm99999915_g1 Gapd (Applied Biosystems, Foster City, USA) für GAPDH in den Abi PrismTM 7700 Sequence Detector (Perkin Elmer, Fremont, USA) eingesetzt.

In diesem Ansatz wird einerseits die Menge an Y-Chromosom, andererseits die an GAPDH, einem so genannten „housekeeping-Gen“, im Blut des transplantierten Tieres ermittelt. Als Kontrolle dient Blut einer gesunden männlichen Maus der eigenen Zucht.

Die Rekonstitutionsrate lässt sich daraufhin folgendermaßen ermitteln (User Bulletin #2, Abi Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, USA): Der ct-Wert des GAPDH-Gens wird vom ct-Wert des Y-Chromosoms subtrahiert; je größer der Wert

dieser Differenz Δct ist, desto weniger Y-Chromosom im Vergleich zu GAPDH-Gen befindet sich in der entsprechenden Blutprobe. Der Δct -Wert des männlichen Kontrolltieres, bei dem in allen Blutzellen das Y-Chromosom enthalten sein muss, dient bei jeder Messung als direkter Vergleichswert. Da es sich bei dem transplantierten Tier jeweils um ein weibliches Tier handelt, das Knochenmark eines männlichen Tieres erhalten hatte, kann man anhand des Δct -Wertes dieses Versuchstieres im Vergleich zum Δct -Werts des Kontrolltieres auf die Menge an Y-Chromosom im Blut des transplantierten Tieres, und damit auf die Rekonstitutionsrate der Blutzellen nach der Knochenmarktransplantation schließen: Subtrahiert man den Δct -Wert der Kontrolle von Δct der Probe, ergibt sich $\Delta\Delta\text{ct}$. Mit diesem $\Delta\Delta\text{ct}$ lässt sich durch die Formel „ $2^{-\Delta\Delta\text{ct}} \times 100\%$ “ die Rekonstitutionsrate in Prozent errechnen.

Im Idealfall müsste $\Delta\Delta\text{ct}$ gleich Null, d. h. die Rekonstitutionsrate gleich 100 %, sein. Durch geringste Messschwankungen ergeben sich allerdings $\Delta\Delta\text{ct}$ -Werte, die sowohl minimal über als auch unter Null liegen können; daraus kann eine errechnete Rekonstitutionsrate von mehr als 100 % resultieren.

3.2.6 Sonographische Messungen

Die sonographische Untersuchung wird bei jedem Tier eine Woche vor der Operation und am Tag nach der Operation, direkt vor der Euthanasie, durchgeführt. Für die Messungen wird ein Ultraschallgerät aus der Humanmedizin (Vivid Five, REF: FC000080, SN: 2941 VM, GE Vingmed Ultrasound, Horten, Norwegen) mit einem 10 MHz Schallkopf und 3,5 cm Eindringtiefe (REF: KW100002, SN: 11122, GE Vingmed Ultrasound, Horten, Norwegen) verwendet.

Für die Anästhesie wird eine reine Isofluran-Inhalationsnarkose durchgeführt. Diese wird mit fünf Volumenprozent in der Plexiglasröhre (eigene Herstellung) eingeleitet und, nach Verlust des Stellreflexes, mithilfe der Inhalationsmaske (eigene Herstellung) bei 1,5 Volumenprozent aufrechterhalten, wobei jeweils ein Sauerstoffflow von 0,6 Liter pro Minute gewährleistet ist (vgl. Kap. 3.2.4). Nachdem zum Schutz vor Austrocknung auf die Kornea Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Roche, Grenzach, D) aufgetragen worden ist, werden die Haare beidseits lateral und sternal am Thorax mithilfe von Enthaarungscreme entfernt (Plica, Glaxosmithkline, Bühl, D). Die Körpertemperatur des Tieres wird während der gesamten Messung konstant auf $37^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ gehalten. Hierfür dient eine Wärmelampe (100W, 240 V) und eine rektal eingeführte Temperatursonde (temperature control, FHC, Browdoingham, ME, USA). Für die Sonographie liegt die Maus auf einem speziell angefertigten Plexiglasgestell (eigene Herstellung).



Das Tier liegt auf einem Gelpad, das sich über einer Aussparung des Plastikgestells befindet. Die Inhalationsnarkose wird über eine Kopfkammer durchgeführt. Die Körpertemperatur wird permanent über eine rektal eingeführte Sonde gemessen

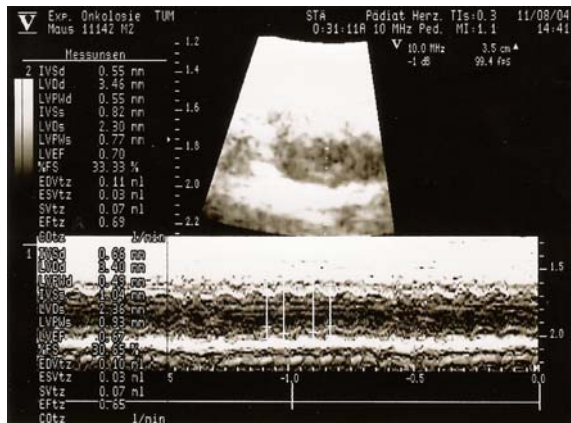
Abb. 7: Durchführung der sonographischen Messungen

Dieses Gestell besitzt eine $8 \times 4,5 \text{ cm}^2$ große rechteckige Aussparung, auf die ein Gelpad als Vorlaufstrecke (Sonopad, Sonotec, Halle, D) gelegt wird. Darauf wird die Maus sternal mit nach vorn und hinten ausgestreckten Gliedmaßen gelagert (vgl. Abb. 7); durch die o.g. Aussparung ist es möglich, über einen rechts parasternal aufgesetzten Schallkopf mit einer Eindringtiefe von 3,5 cm den linken Ventrikel des Tieres darzustellen. Auf diese Weise lässt sich der Kurzachsenschnitt des linken Ventrikels im B-Mode so einstellen, dass man im M-Mode den Durchmesser auf Ebene der Papillarmuskeln sowohl am Ende der Diastole, enddiastolisch (LVDd), als auch am Ende der Systole (LVDs), endsystolisch, messen kann (vgl. Abb. 8).

Aus diesen Werten errechnet sich die linksventrikuläre Verkürzungsfraction oder „fractional shortening“ (FS) in Prozent, indem der Durchmesser des Ventrikels am Ende der Systole von dem am Ende der Diastole subtrahiert und das Ergebnis durch Letzteren dividiert wird. Multipliziert mit 100 ergibt diese Formel das FS in Prozent:

$$FS = \frac{LVDd - LVDs}{LVDd} \cdot 100\%$$

Das FS wird als Maß für die linksventrikuläre Kontraktilität bei den Versuchstieren sowohl eine Woche vor der Operation, als auch 24 Stunden danach durch den Mittelwert der LVDd und LVDs aus jeweils zehn Ultraschalleinstellungen berechnet; durch den Vergleich beider Werte soll eine eventuelle Beeinträchtigung der physiologischen Herzfunktion 24 Stunden nach der Ischämie erkannt werden.



Oben: Kurzachsenschnitt des linken Ventrikels im B-Mode auf Höhe der Papillarmuskeln
 Unten: Darstellung im M-Mode zur Messung des endsystolischen und enddiastolischen Durchmessers (LVDs und LVDd)

Abb. 8: Bestimmung des fractional shortening

3.2.7 Operationsdurchführung

Vorbereitung des Tieres für die Operation

Die Anästhesie der Maus erfolgt durch eine intraperitoneale Injektion einer Mischung aus Midazolam (Midazolam-ratiopharm[®], Ratiopharm, Ulm, D), in einer Dosierung von 5,0 mg/kg, Medetomidin (Dormitor[®], Pfizer, Karlsruhe, D), in einer Dosierung von 0,5 mg/kg und Fentanyl (FENTANYL-JANSSEN[®], Janssen-Cilag GmbH, Neuss, D), in einer Dosierung von 0,05 mg/kg (nach HENKE und ERHARDT 2004). Eine speziell angefertigte, nicht luftdicht abschließende Kopfmaske (eigene Anfertigung), in die reiner Sauerstoff mit einem Fluss von 0,6 Liter pro Minute eingeleitet wird, soll eine ausreichende Oxygenierung der Maus unter Narkosebedingung gewährleisten. Nachdem Augensalbe auf die Kornea aufgebracht und die Temperatursonde rektal eingeführt worden ist, lässt sich das Fell des Tieres an der linken Thoraxseite sowie ventral an der Halsregion durch Enthaarungscreme entfernen (vgl. Kap. 3.2.6). Anschließend wird die Maus für die Tracheotomie in Rückenlage auf der Wärmematte fixiert, indem man die Vordergliedmaßen, seitlich vom Körper abgespreizt, mithilfe von Klebestreifen (1,25 cm breit, Leucoplast, Beiersdorf AG, Hamburg, D) an der Unterlage fixiert. Sowohl die Tracheotomie als auch die Thorakotomie mit Erzeugung der myokardialen Ischämie werden mikrochirurgisch mit einer zwölffachen Vergrößerung durchgeführt. Dafür dient ein stufenlos einstellbares Dissektionsmikroskop (fibermatic JKH[®], Edward Weck Company, North Carolina, USA). Die Temperatur des Tieres wird während des gesamten Eingriffs mithilfe einer an die Temperatursonde gekoppelten Wärmematte (temperature control, FHC, Browdoingham, ME, USA) konstant auf $37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ gehalten. Die Feineinstellung der Temperatur dieser Wärmematte erfolgt manuell.

Tracheotomie

An der Ventralseite des Halses wird die Haut in Höhe der Larynx in etwa fünf Millimeter Länge mit dem Skalpell (Feather Disposable Scalpel, NO 22, PFM, Köln, D) durchtrennt. Die hervorquellende paarige Glandula mandibularis wird ebenfalls in der Medianen vorsichtig stumpf getrennt, so dass sie die Sicht auf den paarigen Musculus sternohyoideus ermöglicht. Nach dem Spreizen dieser beiden stumpf voneinander gelösten Muskelbäuche mithilfe von Haltefäden (monofil, 5-0, Prolene[®], Ethicon, Norderstedt, D) liegt der Kehlkopf und der direkt angrenzende Teil der Trachea frei. Auf diese Weise kann die Trachea zwischen der zweiten und vierten Trachealspange, unter Schonung der parallel verlaufenden Vena thyroidea caudalis, eröffnet werden. Ein weiterer Haltefaden (monofil, 7-0 Prolene[®], Ethicon, Norderstedt, D) wird um den direkt caudal der Schnittstelle liegenden Knorpelring geführt, so dass es durch vorsichtiges Ziehen daran gelingt, eine Metallkanüle (Intubation Cannula for mouse OD 1,1 mm, L 28 mm, Hugo Sachs, Medical Research, March-Hugstetten, D) als Tubus in die eröffnete Trachea zu schieben (vgl. Abb. 9).

Über diesen Tracheotubus kann die Maus an das spezielle Beatmungsgerät (Mini Vent Type 845, Hugo Sachs, March-Hugstetten, D) angeschlossen und für die Dauer der gesamten Operation mit 120 Atemzügen pro Minute bei einem Tidalvolumen von 180 µl und einer Zufuhr von 0,8 Volumenprozent Isofluran bei einem Sauerstoffflow von 0,6 l/min (vgl. Kap. 3.2.6) beatmet werden

Thorakotomie und ventrikuläre Ischämie

Für die Durchführung der lateralen Thorakotomie ist eine Umlagerung des Tieres notwendig. Die Maus wird vorsichtig in die rechte, gestreckte Seitenlage gebracht, indem beide Vordergliedmaßen ohne Zug nach vorn, die rechte Hintergliedmaße nach hinten gestreckt mit Klebeband (s. o.) an der Unterlage befestigt werden.

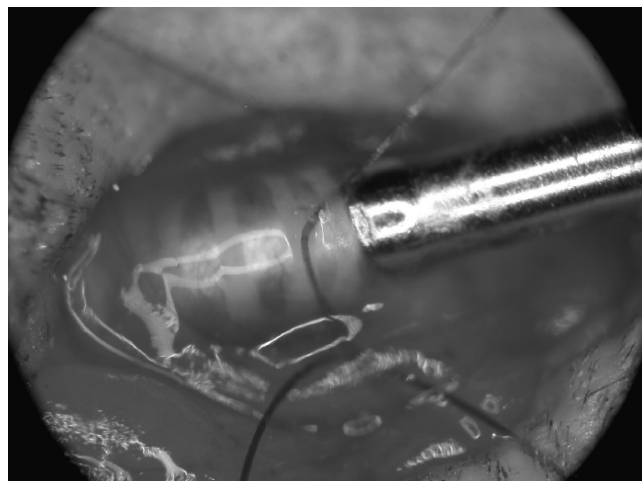


Abb. 9: Einführen der Metallkanüle in die Trachea

Die Durchtrennung der Haut erfolgt im vierten Interkostalraum, in dorso-ventraler Richtung auf Höhe der Rippen-Knorpel-Grenze. Nachdem der *Musculus cutaneus trunci* an dieser Stelle durchschnitten worden ist, erfolgt die Auftrennung des *Musculus serratus ventralis* entlang seines Faserverlaufs. Nachdem man anschließend die *Musculi intercostales externi* und *interni* zusammen mit der *Pleura costalis* des vierten Interkostalraumes durchtrennt hat, ist der Thorax vollständig eröffnet. Kleinere kapilläre Blutungen werden jeweils mithilfe zurechtgeschnittener Saugtupfer (Ethikeil[®], Ethicon, Norderstedt, D), größere oder anhaltende Blutungen durch einen batteriebetriebenen Mikrokoagulator (small vessel cauterizer, FST, Heidelberg, D) gestillt. Um eine möglichst gute Übersicht für den Eingriff zu erreichen, wird der Interkostalraum vorsichtig mit einem Rippenspreizer (17008-07, FST, Heidelberg, D) geweitet und offen gehalten. Die kollabierte linke Lunge wird gegebenenfalls mit einem Saugtupfer (Ethikeil[®], s. o.) nach dorsal geschoben, das Mediastinum eröffnet und das Perikard gefens-tert, so dass das linke Herz vollständig frei liegt. Ventral des linken Herzohres an der *Facies auricularis* lässt sich die *Arteria coronaria sinistra* in der Regel gut erkennen, eine bessere Darstellung des Gefäßes gelingt dadurch, dass man ein Stück zurechtgeschnittenen Ethikeils[®] (s. o.) vorsichtig unter das Herzohr schiebt, es dadurch etwas nach dorsal und von der *Facies auricularis* abhebt. Mit einem Faden (Vicryl[®] 8-0, Ethicon, Norderstedt, D) wird die Arterie ca. einen Millimeter apikal des Atriums untersto-chen. Anschließend legt man ein etwa zwei Millimeter langes Stück Polyethylen-Schlauch (Polyethylen tubing, ID 0,28 mm, OD 0,61 mm, SIMS, Portex, UK) auf das Gefäß und ligiert dieses zusammen mit der Arterie. Da-durch ist es möglich, die Ligatur später wieder zu lösen. Den vollständigen Verschluss des Gefäßes und die daraus entstehende Ischämie des linken Ventrikels erkennt man an der deutli-chen Farbänderung des Gewebes distal der Ligatur: das rote Myokard wird blassrosa. Der Teil der Arterie distal der Ligatur ist nicht mehr erkennbar, in den meisten Fällen treten außerdem sichtbare, reversible Arrhythmien auf. Die linksventrikuläre Ischämie wird für die folgenden 30 Minuten aufrechterhalten. In dieser Zeitspanne findet weiterhin eine genaue Überwachung und Regelung der Körpertemperatur des Tieres statt (s.o.). Um ein Austrocknen der freilie-genden Organe des Thorax zu verhindern, wird der Rippenspreizer für die Dauer der Ischämie geschlossen und die Wundränder mit Elektrolytlösung (Ringer-Spüllösung, DeltaSelect, Pfullingen, D) feucht gehalten. Nach genau 30 Minuten wird der Polyethylen-Schlauch aus der Ligatur gezogen, der Faden durchschnitten und entfernt. Durch die erneute Farbänderung des Ventrikels von blassrosa zu rot, sowie durch die distal der Ligatur wieder sichtbare *Arteria coronaria sinistra* lässt sich die Reperfusion des Myokards verifizieren.

Verschluss der Thorakotomie- und Tracheotomiewunde

Zum Thoraxverschluss werden zunächst Einzelhefte (6-0, Vicryl[®], Ethicon, Norderstedt, D) um die vierte und fünfte Rippe vorgelegt und bis auf eines zugeknötet. Durch dieses führt man einen speziell angefertigten Katheter (eigene Herstellung), der über einen Dreiwegehahn mit einer 1-ml-Spritze verbunden ist, in den Thorax ein. Auf diese Weise erreicht man durch vorsichtiges Absaugen der Luft und anschließendem Festziehen des letzten Heftes, mit Entfernen des Katheters, einen ausreichenden Unterdruck im Brustkorb. Die folgende Muskel- und Fasziennaht erfolgt fortlaufend ebenfalls mit einem 6-0 Vicryl[®] - Faden (s.o.). Als letztes wird die Haut mit U-Heften verschlossen (6-0, Prolene[®] blau, Ethicon, Norderstedt, D).

Wenige Minuten vor Entfernung des Tracheotubus verringert man die Isofluran-Konzentration schrittweise, bis die Maus für ca. zwei Minuten mit reinem Sauerstoff beatmet wird. Setzt nach Extubation die Spontanatmung nicht unmittelbar ein, wird das Tier reintubiert, für einige Minuten weiter ohne Narkosegas beatmet und erneut extubiert. Sobald die Atmung selbstständig stattfindet, wird die Trachea mit einem Einzelheft (8-0, Vicryl[®], Ethicon, Norderstedt, D) verschlossen und die Sauerstoffzufuhr durch eine spezielle Kopfmassage (eigene Herstellung) aufrechterhalten. Zum Verschluss der Hautwunde am Hals genügen zwei bis drei U-Hefte (6-0, Prolene[®], s.o.).

Nach Beendigung der Operation bringt man die Maus in Bauchlage und verabreicht ihr zur Antagonisierung der Injektionsnarkose eine Mischung aus Atipamezol (Antisedan[®], Pfizer, Karlsruhe, D) in einer Dosis von 2,5 mg/kg und Flumazenil (Anexate[®] 0,5, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach Whylen, D) in einer Dosis von 0,5 mg/kg subkutan (nach HENKE und ERHARDT 2004).

Postoperative Phase und Analgesie

Zur Analgesie erhalten die Tiere ca. 40 Minuten vor Ende der Operation jeweils eine subkutane Injektion von 5 mg/kg Carprofen (Rimadyl[®], Pfizer, Karlsruhe, D) und 0,1 mg/kg Buprenorphin (Temgesic[®], ESSEX Pharma, München, D). Postoperativ werden sie weiterhin mit Buprenorphin in gleicher Dosierung alle acht Stunden bis zur Euthanasie versorgt. Während der 24-stündigen Reperfusionphase setzt man die Tiere einzeln in einen mit Zellstoff ausgelegten Käfig, wobei sie freien Zugang zu Wasser und ihrem gewohnten Futter (vgl. Kap. 3.2.1) haben. Mit einer Rotlichtlampe soll genügend Wärmezufuhr für die nach dem Eingriff geschwächten Tiere gewährleistet werden.

3.2.8 Euthanasie und Färbung des Herzgewebes

Nach einer genau 24-stündigen Reperusionsphase wird eine erneute Ultraschallmessung durchgeführt (vgl. Kap. 3.2.6). Da hierfür die Maus bereits mit einer Isofluran-Sauerstoff-Inhalationsnarkose anästhesiert ist, wird ihr für den anschließenden Eingriff nur noch die halbe Dosis der Mischung aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl intraperitoneal injiziert. Nachdem die Maus in Rückenlage auf der Wärmematte gelagert, die Temperatursonde rektal eingeführt und die Sauerstoffzufuhr durch die spezielle Kopfmaske gewährleistet ist (vgl. Kap. 3.2.7), erfolgt die Intubation des Tieres. Hierfür löst man die Hauthefte, stellt auf dieselbe Art wie am Tag zuvor die Trachea dar und entfernt zuletzt das Heft, durch das die Tracheotomiewunde verschlossen ist, um den Tubus einführen zu können. Daraufhin findet wieder eine Beatmung mit den gleichen Einstellungen wie am Tag zuvor (vgl. Kap. 3.2.7) statt, die Narkose wird allerdings mit einer Dosis von 2,0 Volumenprozent Isofluran bei 0,6 l/min Sauerstoffflow vertieft. Nach der bereits beschriebenen Umlagerung des Tieres in die rechte Seitenlage wird die Thoraxwunde eröffnet und durch Entfernen einiger Rippen soweit vergrößert, dass eine gute Sicht in die Brusthöhle besteht. Durch Blutentzug aus dem Brustteil der Aorta mit einer Insulinspritze (BD Micro-FineTM, BD Consumer Healthcare, Franklin Lakes, USA), in die etwa 0,01 ml Citrat vorgelegt werden, erfolgt die endgültige Euthanasie des Tieres. Zur Färbung des Herzens wird das Tier jedoch in derselben Lage belassen, die Körpertemperatur weiterhin konstant ($37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) gehalten und die Beatmung mit Sauerstoff fortgeführt; lediglich die Isofluranzufuhr wird eingestellt. Durch einen auf eine 27Gx3/4-Kanüle aufgesetzten, circa 10 cm langen Polyethylenschlauch (vgl. Kap. 3.2.7), der in die Aorta eingeführt wird, und mithilfe einer Gegenöffnung in der Vena cava caudalis auf Höhe ihres Zwerchfelldurchtritts lässt sich das Herz retrograd mit 4 ml Vollelektrolytlösung (vgl. Kap. 3.2.7) spülen. Nachdem auf diese Art das Blut, auch aus den kleineren Gefäßen, entfernt worden ist, schließt man diesen in die Aorta eingeführten Schlauch an eine Perfusionsleitung (1PE Spritzenpumpenleitung, Clinico, Bad Hersfeld, D) an; durch jene wird mithilfe einer Spritzenpumpe (IVAC 770 Spritzenpumpe, IVAC Corporation, San Diego, USA) 50 ml einprozentiger 2,3,5-Triphenyltetrazolium-Chlorid-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, D) unter Lichtabschluss mit einem Flow von 100 ml/h durch das Herz gepumpt. 2,3,5-Triphenyltetrazolium-Chlorid (TTC) wird von mitochondrialen Dehydrogenasen durch oxidative Phosphorylierung zu 1,3,5-Triphenylformazan umgewandelt. Da diese Umwandlung durch die Mitochondrien nur in gesundem Gewebe stattfinden kann und es sich bei dem Produkt 1,3,5-Triphenylformazan um einen roten Farbstoff handelt, lässt sich durch diese Färbung vitales, demnach rot gefärbtes, von ungefärbtem, untergegangenen Gewebe leicht

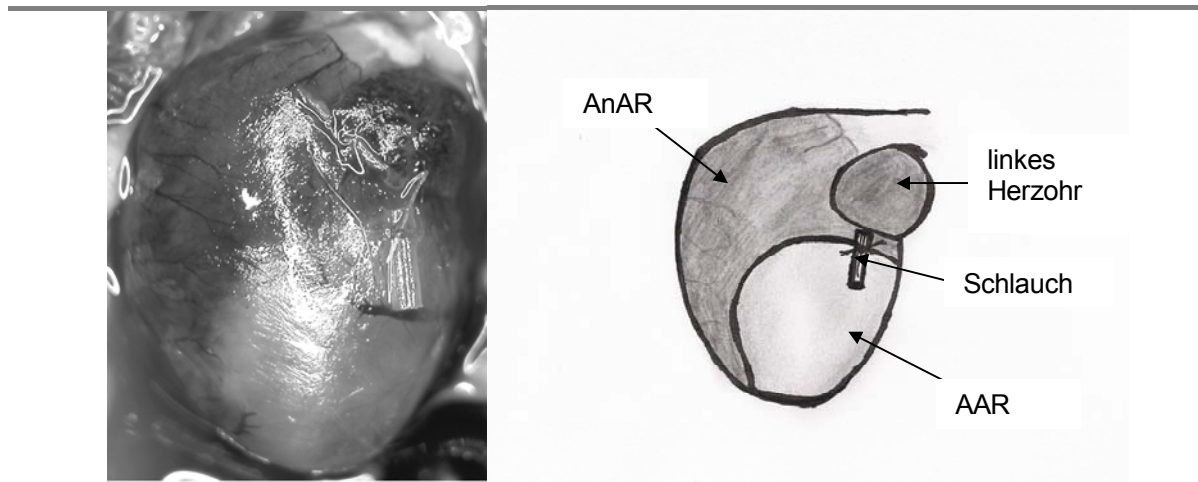


Abb. 10: Exemplarische Darstellung der mit dem Polyethylenschlauch unterlegten Ligatur und der Färbung des Herzens zur Unterscheidung von AAR und AnAR; links: in situ; rechts: Skizze; AnAR: area non at risk (original dunkelblau), AAR: area at risk (original rot); der Infarkt (ungefärbt) liegt in den meisten Fällen größtenteils intramural und ist deshalb nur auf dem Querschnitt deutlich erkennbar (vgl. Abb. 12)

unterscheiden. Nach dieser 30-minütigen Perfusion wird das Herz im Ganzen entnommen und unter dem Mikroskop die Ligaturstelle der Arteria coronaria sinistra von der Operation am Vortag aufgesucht. Auf exakt gleicher Höhe ligiert man dieses Gefäß mit einem Faden (Vicryl® 8-0, vgl. Kap. 3.2.7) ohne untergelegtes Schlauchstück erneut. Anschließend führt man einen auf eine Kanüle (s.o.) aufgesetzten Polyethylenschlauch (s.o.) in den Aortenbogen ein und injiziert dadurch mithilfe einer 1-ml-Spritze einprozentige Evans Blue-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, D) in die Koronargefäße. Dieser blaue Farbstoff färbt das von ihm perfundierte Gewebe kräftig blau ein. Dadurch, dass an derselben Stelle wie am Tag zuvor zur Herbeiführung der myokardialen Ischämie die Koronararterie abgebunden wird, bleibt das während der Ischämiephase nicht durchblutete Gewebe, als „area at risk“ bezeichnet, rot gefärbt. Der darin enthaltene, TTC-ungefärbte Bereich besteht aus untergegangenen Gewebe, stellt also den Infarkt dar. Der größte Teil des Herzens, durch Evans Blue dunkelblau gefärbt, ist während der Operation keiner Ischämie ausgesetzt worden (vgl. Abb. 10 und 12).

3.2.9 Aufbewahrung und Auswertung der Proben

Außer dem Herzen wird dem Tier nach der Euthanasie die linke Tibia entnommen und ihre Länge mit einem elektronischen Messschieber (Absolute Digimatic, Mitutoyo, UK) bestimmt. Das Herz wird nach der Färbung vorsichtig trocken getupft (Ethikeil®, Ethicon, Norderstedt, D) und bei -80°C tiefgefroren.

Die Quantifizierung der infarzierten Bereiche wird mithilfe von Bildverarbeitungsprogrammen am Computer durchgeführt.

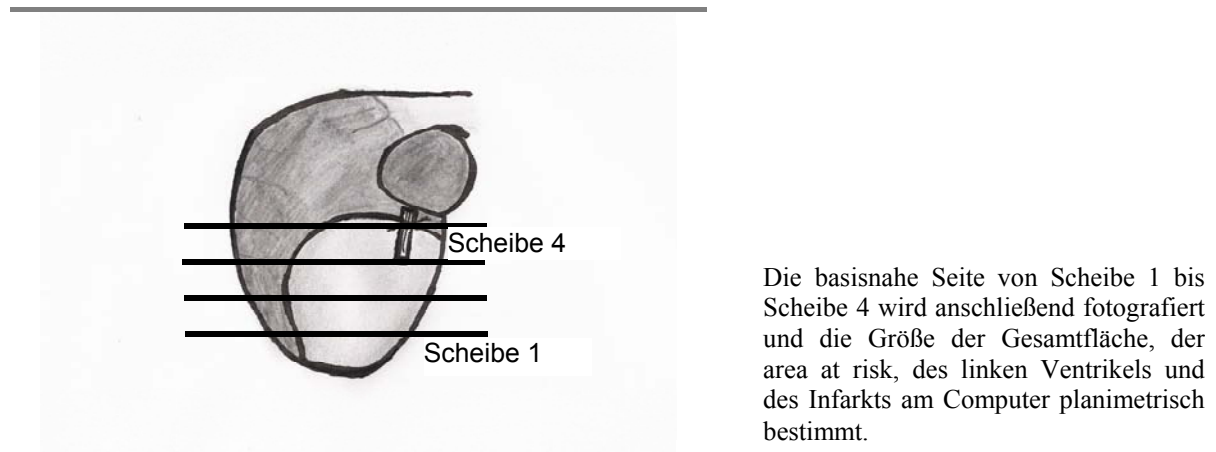


Abb. 11: Darstellung der für die Vermessung wichtigen Schnittebenen am gefärbten Herzen.

Dazu wird das angetaute Herz zunächst in einzelne Scheiben zerteilt: hierfür dient ein speziell angefertigter Gewebeschneider (eigene Herstellung), der aus fünf parallel verlaufenden Klingen besteht, welche in einem Millimeter Abstand voneinander angeordnet sind. Auf diese Klingen wird das Herz, mit seiner Längsachse senkrecht zu deren Verlauf, gelegt und durchtrennt. Dadurch erhält man sechs, bei sehr kleinen Herzen fünf, Querscheiben des Organs. Die apikalen vier, seltener drei, Scheiben enthalten den Bereich distal der Ligatur (vgl. Abb. 11). Die basisnahe Seite dieser betreffenden Schnitte wird neben einer Millimeterskala mit einer Kamera (Nikon® Coolpix 5000, Tokyo, Japan) digital fotografiert und die Bilder im jpeg-Format gespeichert. Jede einzelne aufgetaute Scheibe wird mit einer elektronischen Waage (MC1 Analytic AC 210P, Sartorius AG, Göttingen, D) auf 0,1 mg genau gewogen. Am Computer lassen sich auf den fotografierten Querschnitten folgende Teilflächen unterscheiden:

- dunkelblau = die so genannte area non at risk (AnAR), das heißt, der Bereich proximal der Ligatur, der nicht von der myokardialen Ischämie betroffen war;
- rot = area at risk (AAR), der von den arteriellen Gefäßen distal der Ligatur versorgte und damit für 30 Minuten ischämische Bereich;
- ungefärbt, weiß = der Anteil des durch die fehlende Sauerstoffversorgung endgültig zugrunde gegangenen Gewebes in der area at risk, als Infarkt (I) bezeichnet.

Die entsprechenden Bereiche werden in dem Bildverarbeitungsprogramm Adobe (Version 6.0, Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA) mit heller Farbe umfahren und damit voneinander abgesetzt (vgl. Abb. 12).

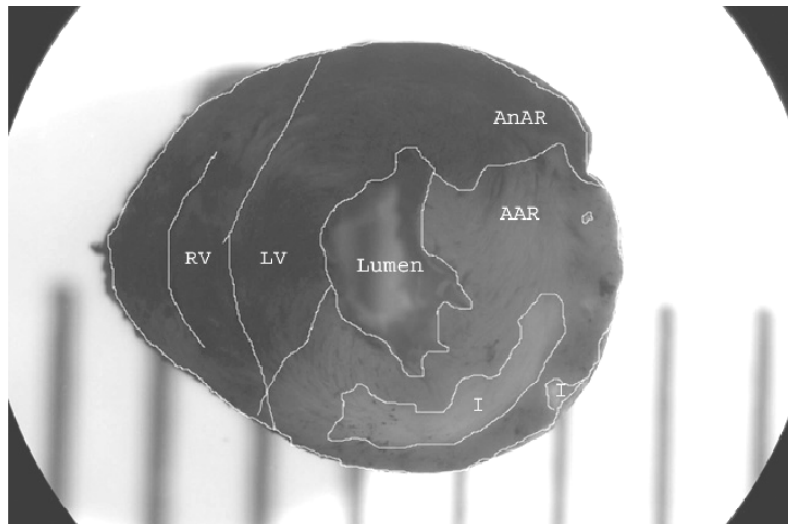


Abb. 12: Fotografie eines Schnittes;
RV: rechter Ventrikel, LV: linker Ventrikel,
I: Infarkt (original: weiß),
AAR: arae at risk (original: rot),
AnAR: arae non at risk (original: dunkelblau)

Durch das Programm Scion image (Version 4.0.2., Frederick, Maryland, USA) lassen sich letztendlich folgende markierte Flächen vermessen, wobei durch die in der Fotografie enthaltene Skala eine absolute Größenangabe möglich ist:

- Gesamtfläche des Schnittes (A_{ges})
- Fläche des linken Ventrikels (LV)
- Fläche der area at risk (AAR)
- Fläche des Infarkts (I)

Setzt man die gemessenen Flächen für den Infarkt, den linken Ventrikel und die area at risk in Bezug zur Gesamtfläche und Masse des betreffenden Schnittes und addiert die daraus berechneten Werte der einzelnen vier Scheiben, ergibt sich jeweils eine für die einzelnen Herzen der Versuchstiere vergleichbare Größe für Infarkt, linker Ventrikel und area at risk: Der entsprechende Wert für den Infarkt im Verhältnis zur area at risk, bzw. zum linken Ventrikel, lässt einen Rückschluss auf die tatsächliche Auswirkung der myokardialen Ischämie und Reperfusion zu. Die Berechnung des Verhältnisses der Größe des Infarktes zur Größe des gefährdeten Gebietes liefert für die einzelnen Herzen vergleichbare Werte für das Ausmaß des durch die Ischämie/Reperfusion entstandenen Schadens:

$$\frac{I}{AAR} = \frac{\sum_{i=1}^4 \frac{I_i}{A_{ges,i}} \cdot m_i}{\sum_{i=1}^4 \frac{AAR_i}{A_{ges,i}} \cdot m_i} \quad \text{bzw.} \quad \frac{I}{LV} = \frac{\sum_{i=1}^4 \frac{I_i}{A_{ges,i}} \cdot m_i}{\sum_{i=1}^4 \frac{LV_i}{A_{ges,i}} \cdot m_i}$$

I=Fläche des Infarktes, AAR=Fläche der area at risk, i=Nummer der Herzscheibe, A_{ges}=Gesamtfläche, m=Masse, LV=Fläche des linken Ventrikels

3.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wird mit dem Programm SPSS 11,5 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Dabei werden insbesondere folgende Daten beider Versuchsgruppen berücksichtigt:

Infarkt bezüglich area at risk: I/AAR

Infarkt bezüglich linkem Ventrikel: I/LV

Fractional shortening der 1. Ultraschallmessung im Vergleich zur 2. Messung: M1-M2

Für den Vergleich der beiden Versuchsgruppen bezüglich Infarktgröße und Ergebnissen der Echokardiographie wird aus den Einzeldaten jeweils der arithmetische Mittelwert (MW) und der Standardfehler (Standard Error of Mean, SEM) für jede Gruppe berechnet. Für den exemplarischen Nachweis der Rekonstitution nach der Knochenmarktransplantation wird der Median und das 95%-Konfidenzintervall der Ergebnisse der einzelnen Messungen ermittelt. Als statistischer Test dient der ONEWAY ANOVA-Test, als Post-hoc-Tests für die oben genannten Variablen werden der Bonferroni-Test und die Scheffé-Prozedur für unabhängige Stichproben verwendet. Dabei wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von weniger als 0,05 (p<0,05) als statistisch signifikant bewertet.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Überlebensrate

Von 38 Mäusen, die einer Bestrahlung mit anschließender Knochenmarktransplantation ausgesetzt werden, stirbt eine Maus sieben Tage nach der Transplantation. Die restlichen 37 Tiere werden der Operation unterzogen. Dabei sterben elf von ihnen während der Operation oder in den ersten Stunden danach vor allem aufgrund übermäßigen Blutverlustes durch den chirurgischen Eingriff. Die Koronararterie einer weiteren Maus zeigt nach dem Lösen der Ligatur keine vollständige Reperfusion, so dass dieses Tier nicht in die Wertung aufgenommen werden kann. Damit werden insgesamt 25 Tiere ausgewertet, davon 14 Wildtyp-Mäuse mit $G\alpha_q$ -Knockout-Knochenmark (Gruppe WI) und elf $G\alpha_q$ -Knockout-Tiere mit Wildtyp-Knochenmark (Gruppe KO).

3.3.2 Allgemeine biologische Daten und Rekonstitution

Die beiden Versuchsgruppen unterscheiden sich signifikant bezüglich des Körper- und Herzgewichtes, wobei die Tiere der $G\alpha_q$ -Knockout-Gruppe (KO) signifikant niedrigere Werte aufweisen (vgl. Tab. 7).

Die Messung der Rekonstitutionsrate wird exemplarisch anhand des Blutes von 17 operierten Tieren durchgeführt. Dabei ergibt sich ein Median von $114 \% \pm 42 \%$ (95 %-Konfidenzintervall).

Dass bei der Berechnung Einzelwerte über 100 % auftreten können, und auch der Median einen Wert von über 100 % aufweist, ist durch die Methode der Rekonstitutionsmessung (vgl. Kap 3.2.5) begründet.

Tab. 7: Allgemeine biologische Daten

Gruppe	Wildtyp mit Knockout-Knochenmark		Knockout mit Wildtyp-Knochenmark	
	MW	SEM	MW	SEM
OP-Alter in Wochen	26,2	0,9	25,1	1,1
Körpermasse in Gramm	25,5	0,9	18,4	0,4
Herzmasse in Milligramm	113,7	3,1	93,1	3,7
Tibiallänge in Millimeter	19,1	0,1	18,6	0,2

3.3.3 Echokardiographie

Der Mittelwert der linksventrikulären Kontraktilität (FS) der ersten Ultraschallmessung (M1) beträgt:

- für die Versuchsgruppe WI (Wildtyp-Tiere mit $G\alpha_q$ -Knockout-Knochenmark):

42,6 % \pm 0,9 %

- für die Gruppe KO (Knockout-Tiere mit Wildtyp-Knochenmark):

43,8 % \pm 0,7 %

Für die zweite Messung (M2) nach der Reperfusionsphase beträgt die FS im Mittel:

- 35,1 % \pm 0,9 % für Gruppe WI

- 39,0 % \pm 1,8 % für Gruppe KO

Weder für die absolute (7,5 % \pm 1,3 % versus 4,8 % \pm 1,8 %) noch für die relative (17,1 % \pm 2,9 % versus 10,8 % \pm 4,0 %) Differenz der beiden Messungen (M2-M1) kann dabei ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (vgl. Tab. 8, Abb.13).

Tab. 8: Ergebnisse der sonographischen Messungen zur linksventrikulären Kontraktilität (FS)

Gruppe	Wildtyp mit Knockout-Knochenmark		Knockout mit Wildtyp-Knochenmark	
	MW	SEM	MW	SEM
fractional shortening M1 in %	42,6	0,9	43,8	0,7
fractional shortening M2 in %	35,1	0,9	39,0	1,8
M1 - M2 Differenz absolut in %	7,5	1,3	4,8	1,8
M1 - M2 Differenz relativ in %	17,1	2,9	10,8	4,0

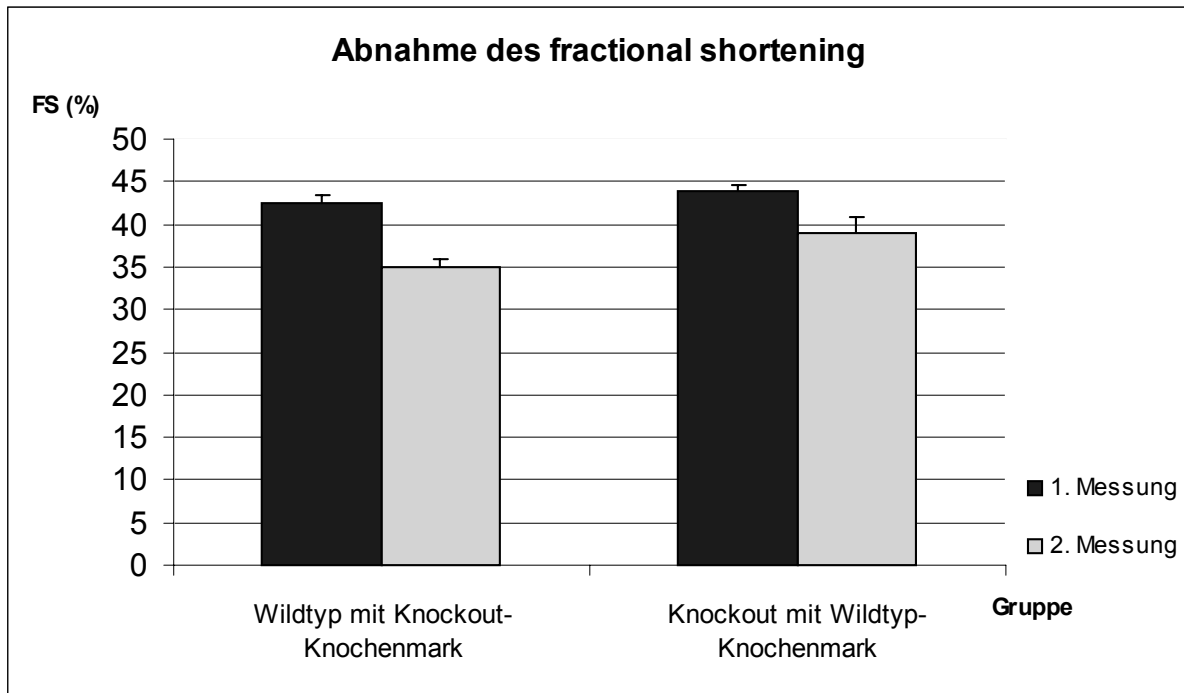


Abb. 13: Abnahme des fractional shortening

3.3.4 Infarktgröße

Die Infarktgröße (I) wird durch die in Kap. 3.2.9 beschriebene Formel zum ischämischen Bereich (area at risk, AAR) und zur Fläche des linken Ventrikels (LV) ins Verhältnis gesetzt.

Dabei ergibt sich für den Anteil des Infarktes an der area at risk (I/AAR)

- für die Gruppe WI ein mittlerer Wert von $18,2 \% \pm 4,2 \%$
- für die Gruppe KO dagegen $10,0 \% \pm 3,7 \%$.

Setzt man den Infarkt ins Verhältnis zum linken Ventrikel (I/LV), ergibt sich ein mittlerer Wert von

- $9,5 \% \pm 2,7 \%$ für Gruppe WI
- $5,6 \% \pm 2,2 \%$ für die Gruppe KO

Weder das Verhältnis von Infarkt zur area at risk noch das von Infarkt zur Fläche des linken Ventrikels unterscheiden sich signifikant in den beiden Gruppen (vgl. Tab. 9 sowie Abb. 14 und 15). Jeweils ein Beispiel dafür, wie sich ein relativ großer bzw. ein kleiner Infarkt in den ersten drei Schnittebenen darstellt, ist in Abb. 17 bzw. Abb. 18 zu finden.

Tab. 9: Ergebnisse der planimetrischen Berechnungen (alle Angaben in %)

Gruppe	Wildtyp mit		Knockout mit	
	Knockout-Knochenmark		Wildtyp-Knochenmark	
	MW	SEM	MW	SEM
area at risk (AAR) zu Gesamtfläche	40,7	2,6	40,8	2,2
Infarkt zu area at risk I/AAR	18,2	4,2	10,0	3,7
Infarkt zu linkem Ventrikel I/LV	9,5	2,7	5,6	2,2

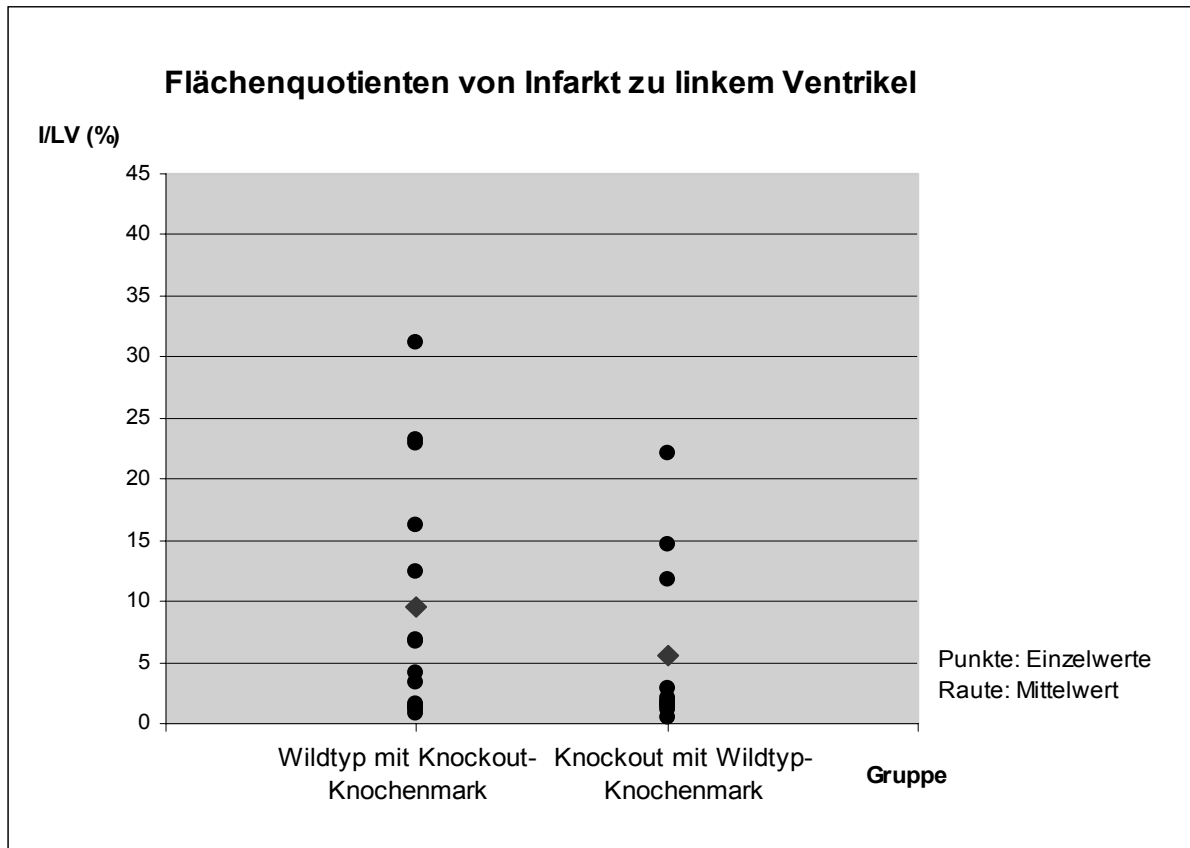


Abb. 14: Einzeldaten und Mittelwerte für den Flächenquotienten von Infarkt zu area at risk

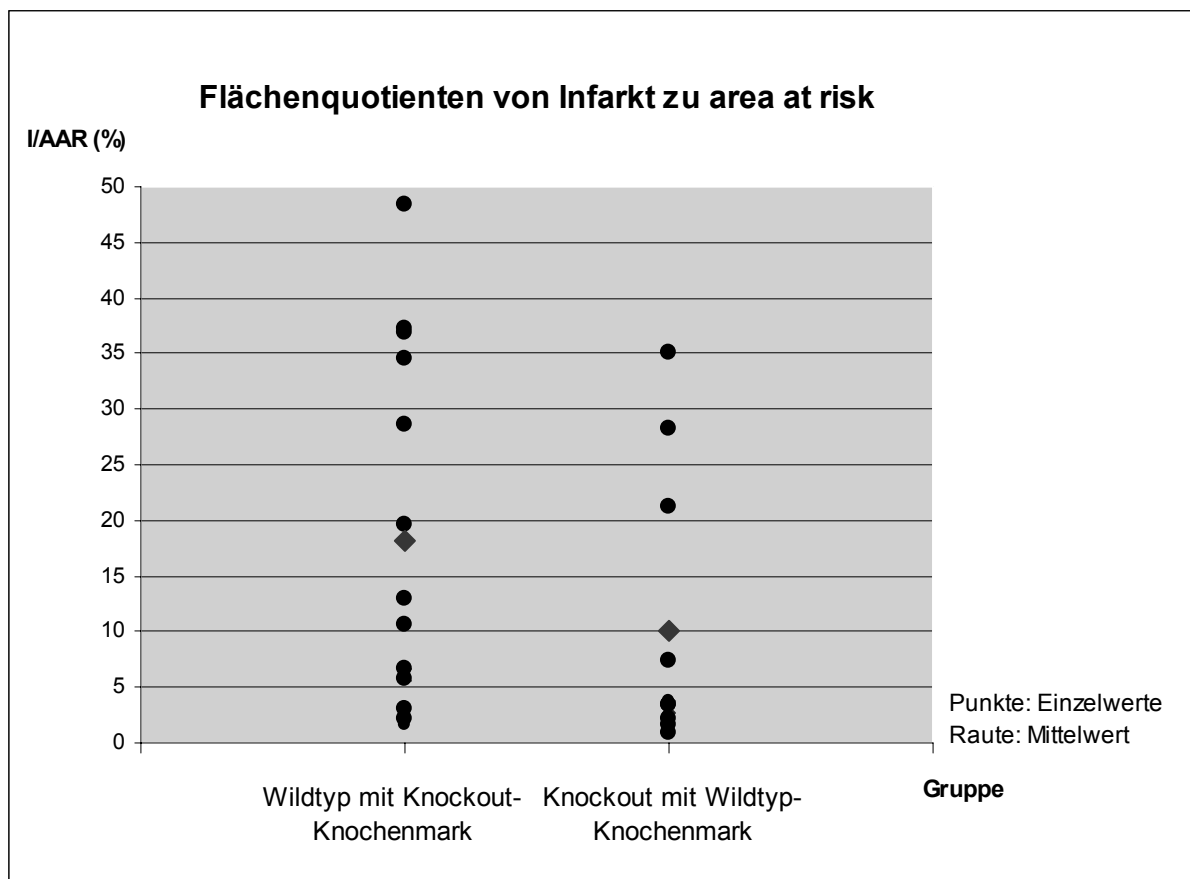


Abb. 15: Einzeldaten und Mittelwerte für den Flächenquotienten Infarkt zu linkem Ventrikel

Die Berechnung des Verhältnisses von Infarktgröße zu Größe der area at risk ergibt einen Wert, der durch die Operation und die physiologisch geringfügig unterschiedlichen Verläufe der Koronararterien der einzelnen Individuen bedingte Unterschiede in der Ausdehnung des ischämischen Bezirkes berücksichtigt, und damit einen objektiven Vergleich der Infarktgröße zwischen den einzelnen Tieren ermöglicht.

Für eine standardisierte Operationstechnik spricht der in den beiden Versuchsgruppen nahezu identische Mittelwert für den Anteil der area at risk an der Gesamtfläche der Herzschnitte (AAR/A_{ges} , vgl. Tab. 9, Abb. 16): Er beträgt

- in der Gruppe WI $40,7 \% \pm 2,6 \%$
- in der Gruppe KO $40,8 \% \pm 2,2 \%$

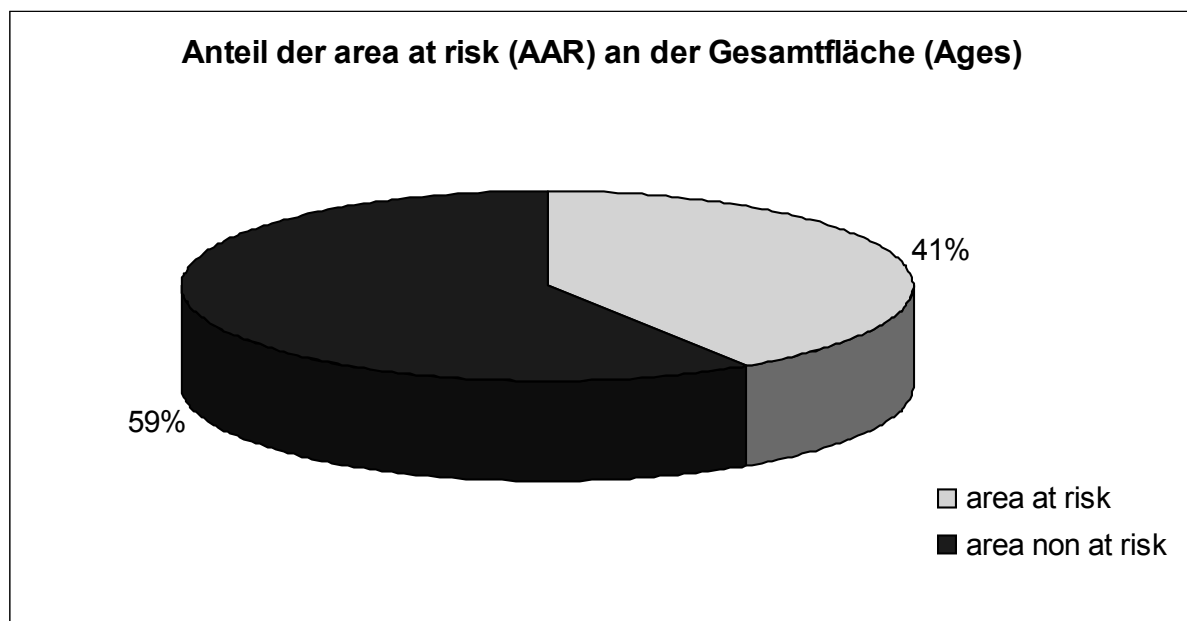
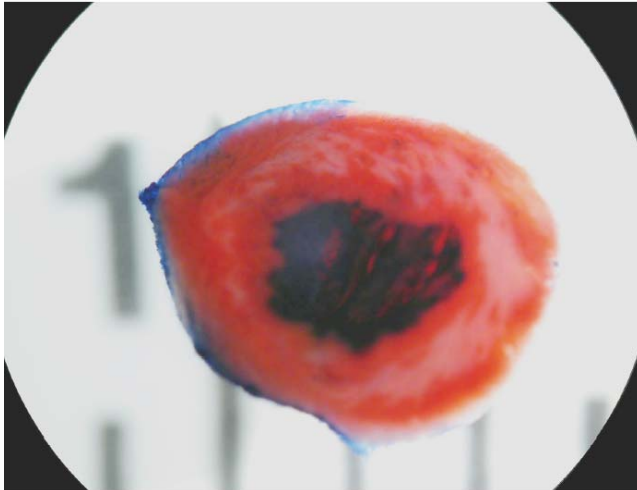
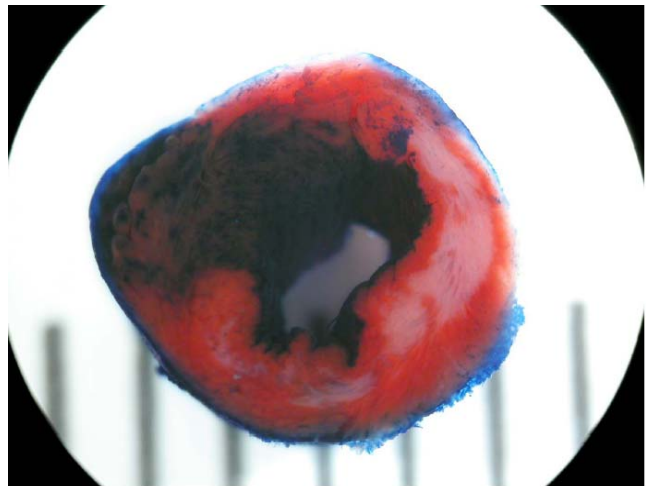


Abb. 16: Anteil der area at risk (AAR) an der Gesamtfläche der Herzschnitte (A_{ges})



Schnitt 1: apikal; Aufsicht von innen auf die Herzspitze; bei der Färbung mit Evans Blue gelangt dieser blaue Farbstoff ins Lumen des linken Ventrikels, deshalb ist das Endothel ebenfalls blau gefärbt

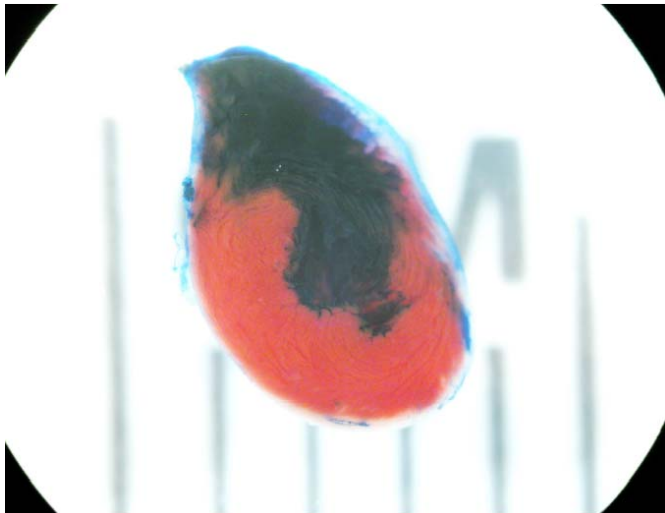


Schnitt 2: das Infarktgewebe (weiß) lässt sich deutlich vom gesunden Gewebe der area at risk (rot) abgrenzen

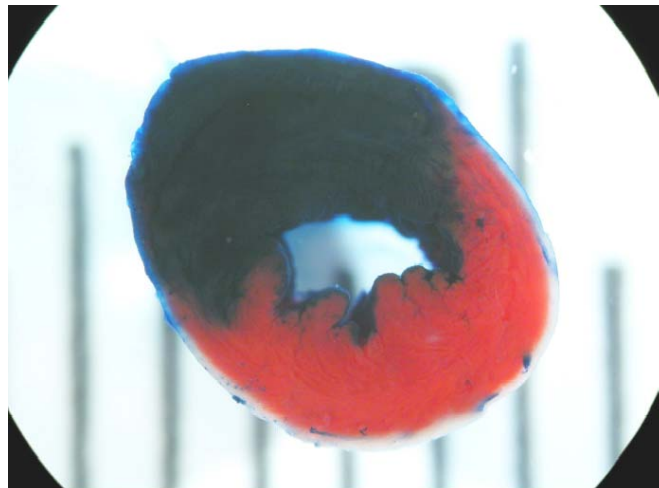


Schnitt 3: deutlich erkennbar ist der Verlauf des kollabierten Lumens des rechten Ventrikels

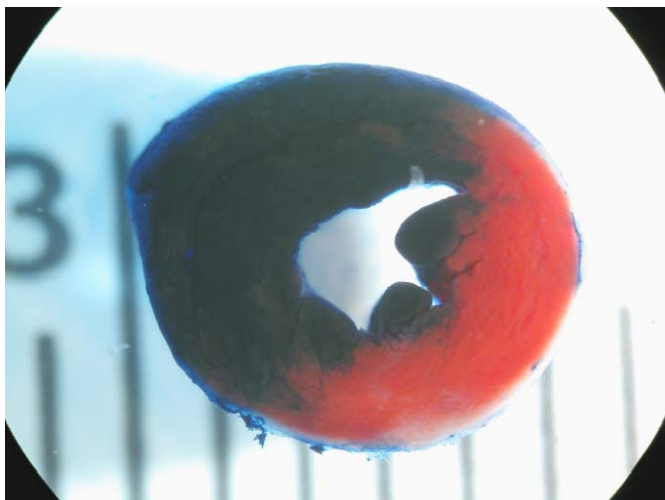
Abb. 17: Beispiel für einen relativ großen Infarkt: I/AAR beträgt etwa 30 %.



Schnitt 1: Aufsicht von innen auf die Herzspitze



Schnitt 2: die area at risk (rot) ist leicht von der area non at risk (dunkelblau) zu unterscheiden



Schnitt 3: dieser Schnitt weist deutlich infarziertes Gewebe auf, wenngleich es nur eine geringe Fläche einnimmt

Abb. 18: Beispiel für einen kleinen Infarkt: I/AAR beträgt etwa 3 %

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Versuchsdurchführung

4.1.1 Die Maus als Tiermodell für myokardiale Ischämie und Reperfusion

Für die Fragestellung dieser Arbeit war die Wahl eines In-vivo-Modells zwingend notwendig. Der komplexe Ablauf der Ischämie/Reperfusion, an dem neben den Thrombozyten eine Vielzahl an weiteren Zellen und Transmittern beteiligt ist (vgl. Kap. 2.2 und Kap. 2.4), ließe sich in einem Ex-vivo-Versuch, wie z. B. einer Perfusion am isolierten Herzen, nicht mit den Vorgängen in vivo vergleichen.

Die Maus bot in diesem Fall den entscheidenden Vorteil, genetisch manipulierte Tiere zur Verfügung zu haben, denen das $G\alpha_q$ -Protein fehlt und deren Nachzucht mit relativ geringem Aufwand selbst durchgeführt werden konnte. Bereits 1978 etablierten ZOLOTAVERA und KOGAN ein Versuchsmodell zur Erzeugung eines okklusiven Myokardinfarkts an der Maus; dabei stellten sie mithilfe von Polarisationsmikroskopie fest, dass die Auswirkungen auf die Morphologie des Myokards durch den chirurgisch herbeigeführten Arterienverschluss mit den Veränderungen nach einer Okklusion bei anderen, größeren Tierarten, aber auch mit den morphologischen Veränderungen in humanem ischämischen Myokard vergleichbar sind.

Wie bereits dargestellt (vgl. Kap. 2.5), handelt es sich bei den verschiedenen Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine um in der Evolution hochkonservierte Signalmoleküle. Die große Übereinstimmung bezüglich ihrer Funktion und Lokalisation zwischen den verschiedenen Säugetierarten lässt den Rückschluss bezüglich der Bedeutung der $G\alpha_q$ -Untereinheit vom Mausmodell auf die Wirkungen dieses Signalmoleküls beim Menschen zu (STRATHMANN und SIMON 1990; WILKIE et al. 1992). Darüber hinaus ist sowohl für die Maus als auch für den Menschen explizit das Fehlen des $G\alpha_q$ -Proteins im Thrombozyten belegt (JOHNSON et al. 1996).

Auch die Blutgefäßversorgung am Mäuseherzen ist insofern mit der des menschlichen Herzens vergleichbar, dass, anders als z. B. beim Meerschweinchen, eine physiologisch ausgeprägte Kollateralversorgung fehlt, so dass als Folge des Koronararterienverschlusses ein Infarkt entsteht (HARKEN et al. 1981; VERDOUW et al. 1998).

Ein Nachteil dieses Tiermodells besteht darin, dass der Verschluss des Koronargefäßes durch eine Okklusion der Arterie von außen erreicht wird. Für die Entwicklung eines Myokardinfarktes beim Menschen ist dagegen in der Regel eine Obstruktion des Gefäßlumens, z. B. durch den entstehenden Thrombozytenpfropf nach der Ruptur einer atheromatösen Plaque verantwortlich. Die dabei entstehenden Gefäßwandläsionen, die Aktivierung von Entzündungs-

dungszellen und das Auslösen bestimmter biochemischer Reaktionen, wie z. B. der Gerinnungskaskade, können durch dieses Infarktmodell nicht dargestellt werden (FALK 1985; RIEDE und DREXLER 1999). Im klinischen Fall jedoch sind die direkten Auswirkungen der Ischämie/Reperfusion schwer von diesen Vorgängen abzugrenzen, die bereits im Laufe des Gefäßverschlusses entstehen. So liegt z. B. bereits vor dem Einsetzen der Ischämie eine verstärkte Thrombozyten-Aktivierung vor, die im Tierversuch nicht berücksichtigt werden kann. Um z. B. für den klinischen Fall einer atherosklerotischen Erkrankung die Veränderungen der Gefäßwand und die daraus entstehenden biochemischen und zellphysiologischen Prozesse in Zusammenhang mit einer definierten Ischämie exakt nachzustellen, müsste im Tiermodell eine Obstruktion des Arterienlumens an definierter Stelle erfolgen; das ist allerdings nicht durchführbar.

Mit der gewählten Versuchsdurchführung werden gezielt die Auswirkungen der Ischämie- und Reperfusionsphase untersucht. Da jedoch nachgewiesen ist, dass allein durch die Ischämie mit anschließender Reperfusion das Endothel in einen pro-koagulatorischen Zustand versetzt wird, indem eine Anlagerung von Fibrinogen die Bindung der Thrombozyten an die Gefäßwand ermöglicht (MASSBERG et al. 1999; vgl. Kap. 2.4.2), werden Komplikationen im Sinne einer Rethrombosierung oder einer Embolisierung der Mikrozirkulation in diesem Modell durchaus berücksichtigt. Das angewandte Mausmodell schien deshalb für die Fragestellung die beste Methode, den Ischämie/Reperfusionsschaden und dessen Beeinflussung durch das $G\alpha_q$ -Protein in vivo zu untersuchen.

4.1.2 Durchführung der Knochenmarktransplantation

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bestrahlung vor der Knochenmarktransplantation mit einer letalen Einzeldosis von 9,5 Gy durchgeführt. Zwar schreiben CUI et al. (2002), dass eine fraktionierte Bestrahlung mit entsprechend höherer Gesamtdosis eine bessere Rekonstitution der Tiere gewährleistet als durch eine Einzeldosis erreicht werden kann. Allerdings basieren diese Ergebnisse auf einer Anzahl von 3×10^6 transplantierten Zellen; bei einer Zahl von 1×10^7 transplantierten Zellen lassen sich hingegen keine Unterschiede bezüglich der Rekonstitution und der Überlebensrate zwischen der fraktionierten Bestrahlung mit jeweils 6 Gy und der Einzeldosis von 9,5 Gy feststellen (CUI et al. 2002). Mit einer in dem vorliegenden Versuch transplantierten Menge von mindestens $2,5 \times 10^7$ Knochenmarkzellen erhielten die bestrahlten Tiere somit ein Vielfaches der Anzahl an Zellen, die für eine vollständige Rekonstitution ausreichend ist.

Die Messung der Rekonstitutionsrate mithilfe des TaqManTM-Verfahrens ergab einen Median von $114 \% \pm 42 \%$ (95 %-Konfidenzintervall). Bei der Berechnung des Wertes für die Menge

des Y-Chromosoms im Vergleich zu dem housekeeping-Gen in den Blutzellen wäre der Wert von $\Delta\Delta\text{ct}$ im Idealfall exakt gleich Null. Durch kleinste unvermeidbare Messungenauigkeiten ergeben sich allerdings häufig negative Werte nahe Null, die rechnerisch zu einer Rekonstitutionsrate von größer 100 % führen (vgl. Kap. 3.2.5). Deshalb kann man aufgrund dieses errechneten Medians letztendlich von einer vollständigen Rekonstitution der Tiere ausgehen.

Eine direkte Methode zur Bestimmung der Rekonstitutionsrate in diesem Versuch wäre die Messung der Menge an Knockout- und Wildtyp-Allelen des Ga_q -Gens im Blut der operierten Tiere. Zwar wurde die Bestimmung dieser Gensequenzen qualitativ zur Genotypisierung der Tiere (vgl. Kap. 3.2.2) durchgeführt; die dafür verwendete Methode erlaubt allerdings keine quantitative Aussage. Um eine Rate für die Rekonstitution der Empfängertiere angeben zu können, hätten für das TaqManTM-Verfahren spezielle Primer für die entsprechenden Gensequenzen evaluiert werden müssen, worauf wegen der guten exemplarischen Ergebnisse mithilfe der verwendeten Methodik verzichtet wurde.

Für die Festlegung einer Zeitspanne zwischen Knochenmarktransplantation und Operation war insbesondere entscheidend, diese ausreichend lang zu wählen, um von physiologischen Thrombozytenzahlen im peripheren Blut zum Zeitpunkt der Ischämie ausgehen zu können. In den ersten Wochen nach einer Bestrahlung mit anschließender Knochenmarktransplantation lässt sich im Blut der Empfängertiere eine deutliche Thrombozytopenie beobachten. So zeigt die Studie von BRADFORD et al. (1993), dass 30 Tage post transplantationem für die Anzahl der Thrombozyten im peripheren Blut signifikant geringere Werte gemessen werden im Vergleich zu der physiologischen Anzahl von etwa 1000×10^9 pro Liter. Zum Zeitpunkt der nächsten Zählung der Blutplättchen am Tag 90 post transplantationem in dieser Studie hatte die Thrombozytenanzahl hingegen wieder normale Werte erreicht, die sich nicht von denen unbehandelter Kontrollmäuse unterschieden, und blieb über einen Zeitraum von 270 Tagen konstant. Die Untersuchung von SKORSKI et al. (1988), die unter anderem ebenfalls Messungen bezüglich Thrombozytenzahlen nach einer Knochenmarktransplantation durchführten, zeigte bereits am Tag 56 post transplantationem physiologische Thrombozytenzahlen im Blut. Aufgrund dieser Angaben in der Literatur ist davon auszugehen, dass der in der vorliegenden Arbeit gewählte Zeitraum für die Rekonstitutionsphase ausreichend war, um physiologische Thrombozytenzahlen im peripheren Blut zu gewährleisten (SKORSKI et al. 1988; BRADFORD et al. 1993).

4.1.3 Durchführung der Operation

Da verschiedenste Parameter, wie z. B. die Ischämiedauer, bestimmte Pharmaka oder die Körpertemperatur des Tieres Einfluss auf die Infarktgröße nehmen können (MIKI et al. 1998; TANAKA et al. 2004), war eine standardisierte Durchführung des Versuches sehr wichtig. Deshalb erhielten alle Tiere die gleiche Anästhesie und Analgesie, die Ischämiedauer betrug exakt 30 Minuten, die anschließende Reperfusionphase 24 Stunden, die Körpertemperatur wurde während der Sonographie, der Operation und der Euthanasie auf $37\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ konstant gehalten.

Von besonderer Bedeutung für die Größe des Infarktes ist die Stelle der Okklusion der Koronararterie (AHN et al. 2004). Die Berechnung des Verhältnisses von Infarkt zu area at risk (I/AAR) lässt zwischen den einzelnen Tieren eindeutig einen Vergleich zu, trotz unterschiedlicher Ausdehnung des ischämischen Bezirkes aufgrund von Abweichungen der Okklusionsstelle oder des genauen Verlaufs der Koronararterie. Damit ist er repräsentativer als die Berechnung des Verhältnisses von Infarkt zu linkem Ventrikel (I/LV), da dieser Wert nicht von der Ausdehnung der herbeigeführten Ischämie abhängt.

Der nahezu identische Mittelwert für den Anteil der area at risk an der Gesamtfläche für die beiden Versuchsgruppen ($40,7\% \pm 2,6\%$ versus $40,8\% \pm 2,2\%$) spricht für eine hohe Standardisierung bei der Durchführung der chirurgischen Intervention.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Körper- und Herzgewicht

Bezüglich der Größen des Körper- und Herzgewichtes wiesen die $G\alpha_q$ -Knockout-Tiere signifikant geringere Werte auf, obwohl das Operationsalter sich zwischen den beiden Gruppen nicht unterschied. Das war zu erwarten, da $G\alpha_q$ -Knockout-Mäuse neben ihren auffälligen Ataxien makroskopisch durch ihren zierlicheren Körperbau von gleichaltrigen Wildtyp-Tieren unterschieden werden können. Dies hat aber keinen Einfluss auf die Ausprägung der Infarktgrößen, da bei der Berechnung der Flächenquotienten für Infarkt zu area at risk (I/AAR) und für Infarkt zu linkem Ventrikel (I/LV) alle gemessenen Flächen mit der Masse der einzelnen Schnitte gewichtet werden.

4.2.2 Echokardiographie

Die Tatsache, dass die sonographische Untersuchung des Herzens mit einer absoluten Differenz von $7,5 \% \pm 1,3 \%$ versus $4,8 \% \pm 1,8 \%$ und einer relativen Differenz von $17,1 \% \pm 2,9 \%$ versus $10,8 \% \pm 4,0 \%$ keinen signifikanten Unterschied zwischen Versuchsgruppe WI (Wildtyp-Tiere mit Knockout-Knochenmark) und Versuchsgruppe KO (Knockout-Tiere mit Wildtyp-Knochenmark) in der Abnahme des fractional shortening (FS) nach der Reperfusionsphase zeigte, entspricht den nicht signifikant unterschiedlichen Infarktgrößen.

Allerdings könnte dieses Ergebnis der sonographischen Messungen auch darauf zurückzuführen sein, dass eine Funktionsstörung des Herzens zu diesem Zeitpunkt nach der Ischämie noch nicht vollständig ausgeprägt ist. Einer Hyperkontraktilität der dem Infarkt gegenüberliegenden Wand könnte die verminderte Beweglichkeit der infarzierten Wand kompensieren und damit die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen verschleiern. Funktionsstörungen am Herzen durch den Infarkt ließen sich besser durch eine Messung nach einer längeren Reperfusionsphase darstellen, wenn die Umbauprozesse im geschädigten Myokard ihr endgültiges Ausmaß erreicht haben. Andererseits muss man davon ausgehen, dass sich, aufgrund der sehr geringen Größe des Mäuseherzens, Unterschiede bezüglich der Kontraktilität im eindimensionalen M-Mode nicht zuverlässig darstellen lassen. Neben dem Problem, standardisierte Grundeinstellungen an einem Organ dieser Größe vorzunehmen, ergeben sich Schwierigkeiten, insbesondere bei kleinen Infarkten, diese in der gewählten Schnittebene zu erfassen. Für eine Verifizierung der Ergebnisse müssten weiterführende, aufwendigere sonographische Untersuchungen, wie z. B. eine dreidimensionale Echokardiographie zur Messung der Ejektionsfraktion oder eine zweidimensionale Messung mit Kontrastmittel zur Berechnung des fractional area change (FAC) durchgeführt werden (SCHERRER-CROSBIE et al. 1999;

SUEHIRO et al. 2001).

Auf invasive Methoden zur Messung hämodynamischer Parameter, wie z. B. einer Tip-Katheter-Messung wurde wegen des schweren chirurgischen Eingriffs am Herzen und der hohen Gefahr für Komplikationen aufgrund der gestörten Blutgerinnung, bedingt durch das Fehlen des $G\alpha_q$ -Proteins in den Thrombozyten, bewusst verzichtet.

4.2.3 Infarktgröße

Interpretation der Ergebnisse

Die Tiere der beiden Versuchsgruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Infarktgröße auf. Sowohl die Flächenquotienten für Infarkt zur area at risk (I/AAR), als auch die für Infarkt zu linkem Ventrikel (I/LV) streuen in beiden Gruppen der vorliegenden Arbeit sehr stark um den Mittelwert (vgl. Abb. 14 und 15).

Wie in Kap. 3.1 dargestellt, sollten diese in Bezug auf ihre Blut- und Körperzellen chimären Tiere mit den Versuchsgruppen der bisher unveröffentlichten Studie von HEUER (in Vorbereitung) verglichen werden (vgl. Abb. 19 und 20). In dieser Studie konnte ein signifikanter Unterschied der Infarktgrößen von Wildtyp- und $G\alpha_q$ -Knockout-Tieren gezeigt werden.

Würde die Ursache für die größere Resistenz der $G\alpha_q$ -Knockout-Mäuse gegenüber dem Ischämie/Reperfusionsschaden in der durch diesen Gendefekt gestörten Thrombozyten-Aktivierung liegen, hätten sich die Ergebnisse für die Infarktgrößen bei den transplantierten Tieren umkehren müssen: Für Wildtyp-Tiere, die Knochenmark und damit Thrombozyten mit dem Gendefekt erhielten, wären signifikant geringere Infarktgrößen zu erwarten gewesen als für Knockout-Tiere mit Wildtyp-Blutzellen. Hätte die Störung der Thrombozyten-Aktivierung keinen Einfluss auf die Ausprägung des Ischämie/Reperfusionsschadens, sondern wären bestimmte Effekte in anderen Körperzellen, z. B. den Kardiomyozyten aufgrund des fehlenden $G\alpha_q$ -Proteins für die unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Versuchsgruppen von HEUER (in Vorbereitung) verantwortlich, hätten sich die Ergebnisse für die Infarktgrößen der Wildtyp und Knockout-Tiere durch die Knochenmarktransplantation nicht geändert.

Die Tatsache, dass in den eigenen Untersuchungen zwischen den beiden Gruppen der transplantierten Tiere jedoch kein signifikanter Unterschied bezüglich der Infarktgröße besteht, lässt vermuten, dass die größere Toleranz der $G\alpha_q$ -Knockout-Tiere gegenüber einer myokardialen Ischämie und der anschließenden Reperfusion sowohl auf der gestörten Thrombozytenfunktion als auch auf dem Fehlen dieses Proteins in anderen Körperzellen beruht. Am naheliegendsten scheinen hierfür direkte Effekte in den Kardiomyozyten, die eine geringere Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber den Pathomechanismen der Ischämie/Reperfusion bewirken.

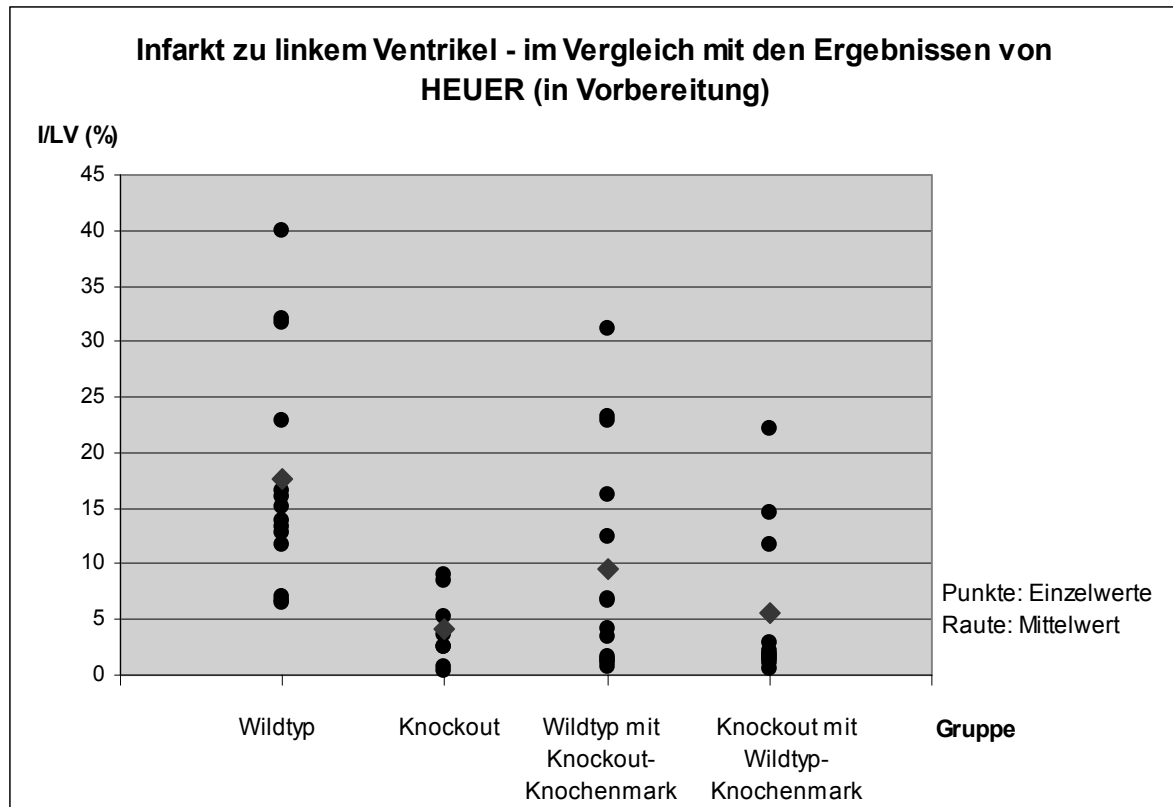


Abb. 19: Flächenquotienten von Infarkt zu linkem Ventrikel; Vergleich der Ergebnisse von HEUER (in Vorbereitung) mit den Ergebnissen für die transplantierten Tiere der vorliegenden Arbeit

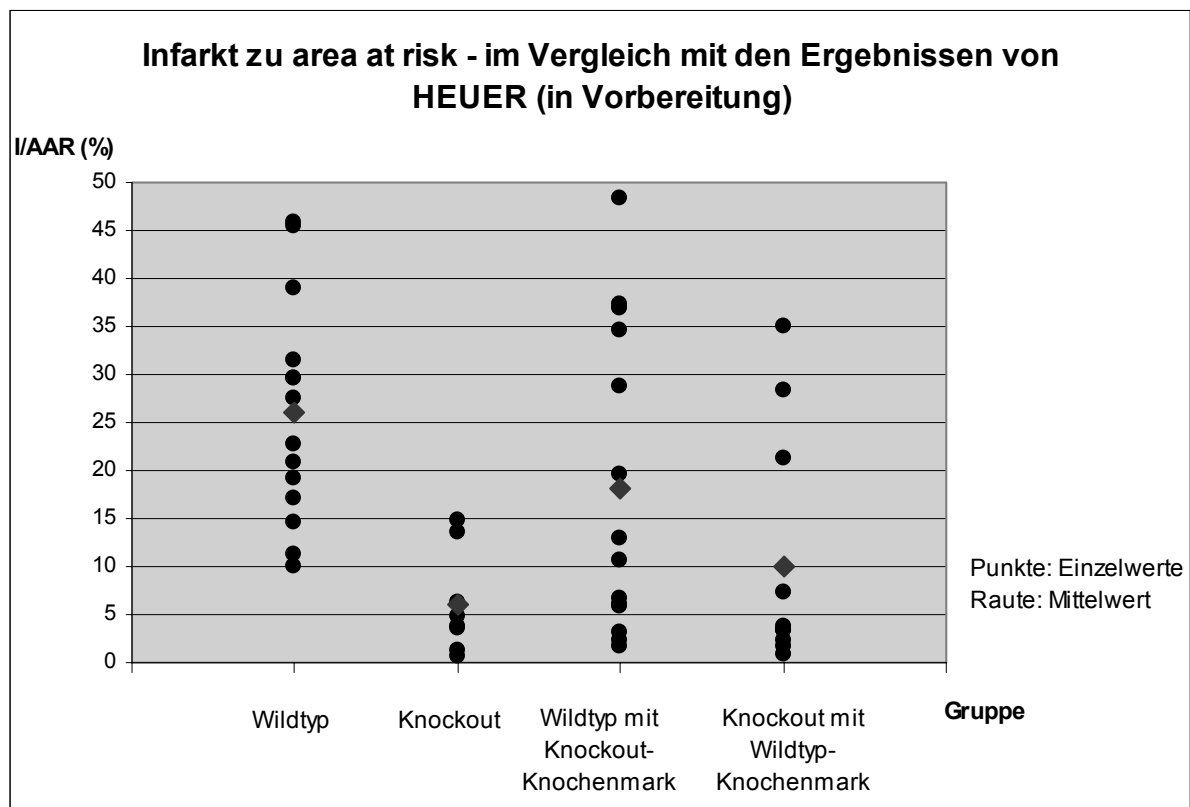


Abb. 20: Flächenquotienten von Infarkt zu area at risk; Vergleich der Ergebnisse von HEUER (in Vorbereitung) mit den Ergebnissen für die transplantierten Tiere der vorliegenden Arbeit

Störung der Thrombozyten-Aktivierung durch den $G\alpha_q$ -Defekt

Die Störung der Thrombozyten-Aktivierung durch den $G\alpha_q$ -Defekt nimmt insofern Einfluss auf die Ausprägung des Ischämie/Reperfusionsschadens, dass die negativen Konsequenzen, die eine Aktivierung dieser Zellen während der Ischämie/Reperfusion für das Überleben des Gewebes mit sich bringt (vgl. Kap. 2.4), durch diesen Defekt wegfallen. Das betrifft nicht nur die Aggregation von Thrombozyten, die letztendlich zu Zellverklumpungen und Störungen vor allem in der Mikrozirkulation führt, sondern vor allem auch die Sekretion der Granula-Inhaltsstoffe. Zu diesen zählen u. a. vasokonstriktorische Mediatoren wie ATP, ADP, Thromboxan A_2 und Serotonin, die einer ausreichenden Reperfusion nach der Ischämie entgegen wirken (GAWAZ 2004). Andererseits bewirken von den Thrombozyten sezernierte chemotaktische Substanzen, wie z. B. β -Thromboglobulin, Plättchenfaktor 4 oder Epitheliales-Neutrophilen-aktivierendes-Protein (ENA) eine Potenzierung der durch die Ischämie/Reperfusion provozierten inflammatorischen Reaktion; dazu trägt auch die Interaktion der aktivierten Blutplättchen mit Endothelzellen und Leukozyten bei (KLINGER und JELKMANN 2002; GAWAZ 2004). Diese Entzündungsreaktion wird unter anderem für eine vor allem in der Mikrozirkulation verringerte Durchblutung während der Reperusionsphase verantwortlich gemacht, was die Heilung des durch die Ischämie geschädigten Myokards wiederum beeinträchtigt (HEARSE et al. 1993; HANSEN 1998; GAWAZ 2004).

Effekte von $G\alpha_q$ im Kardiomyozyten

Während die gestörte Thrombozyten-Aktivierung aufgrund des fehlenden $G\alpha_q$ -Proteins eine feststehende Tatsache ist (OFFERMANN et al. 1997b), können für einen direkten Schutz des Kardiomyozyten gegenüber einer Ischämie/Reperfusion durch das fehlende Signalprotein nur Hypothesen erstellt werden.

Störungen des Zellstoffwechsels und die Ausbildung einer inflammatorischen Reaktion, die sowohl durch die Ischämie aber auch die anschließende Reperfusion entstehen (vgl. Kap. 2.2), führen zum Untergang von Herzmuskelgewebe. Jener beruht zum Teil auf einer Nekrose der stark geschädigten Kardiomyozyten. Merkmale für diesen passiven Zelltod sind der Verlust der Membranintegrität, die Zellschwellung und zerstörte Zellorganellen.

Allerdings lassen sich in postischämischen Herzgewebe auch Anzeichen für Apoptose nachweisen, zu denen eine Spaltung des DNA-Stranges in bestimmte Längen, eine Kondensation und Fragmentation des Zellkerns bei einer intakten Plasmamembran zählen (GOTTLIEB et al. 1994; HOLLEYMAN und LARSON 2001; LOGUE et al. 2005). Dieser programmierte Zelltod ist im Gegensatz zur Nekrose ein aktiver, durch die Transkription bestimmter Gene gesteuerter, energieabhängiger Vorgang, der während der Ischämie/Reperfusion durch ver-

schiedene molekulare Mechanismen in Gang gesetzt wird; dieser mündet letztendlich in eine Aktivierung von Proteasen, den so genannten Kaspasen, welche in der Lage sind, Struktur- und Reparaturproteine der Zelle zu spalten. Dabei werden extrazelluläre Signale z. B. durch Zytokine, wie den vor allem bei chronischen Erkrankungen aus Makrophagen freigesetzten Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), über verschiedene Moleküle intrazellulär weitergeleitet (HOLLEYMAN und LARSON 2001). Eine Freisetzung von Cytochrom c oder Apoptose-induzierendem-Faktor (AIF) aus geschädigten Mitochondrien ist ein weiterer Weg, diese Kaspasen zu aktivieren und damit den Tod der Zelle herbeizuführen (RIEDE und SCHAEFER 1999; ADAMS et al. 2000).

Ebenso existieren in den Zellen anti-apoptotische Signalmoleküle, die durch extrazelluläre Liganden aktiviert werden können, z. B. durch Insulin (UEDA et al. 2004). Das Verhältnis zwischen diesen apoptotischen und anti-apoptotischen intrazellulären Second-messenger-Molekülen ist entscheidend für das Überleben oder den Untergang der Zelle.

Es existiert eine Vielzahl solcher Signalmoleküle, zu denen sowohl die so genannten Mitogen aktivierten Kinasen (MAP Kinasen) als auch die Proteinkinase Akt zählen. Diese Enzyme werden in den Kardiomyozyten unter anderem durch den $G_{\alpha_{q/11}}$ -Signalweg beeinflusst. Wie in Kap. 2.6.3 beschrieben, entwickeln Tiere, die eine aktive Form des G_{α_q} -Proteins überexprimieren, eine myokardiale Hypertrophie; im Gegensatz zu Mäusen mit normaler G_{α_q} -Protein-Aktivierung im Myokard, die aufgrund einer Drucküberlastung eine kompensierte Hypertrophie entwickeln, entsteht aus der durch hohe G_{α_q} -Protein-Aktivität induzierten Form jedoch eine dekompenzierte Kardiomyopathie (D'ANGELO et al. 1997; MENDE et al. 1998; SAKATA et al. 1998).

An Kardiomyozyten in der Zellkultur konnte nachgewiesen werden, dass hohe Mengen an aktivem G_{α_q} -Protein zur Apoptose dieser Zellen führt (ADAMS et al. 1998). Die Autoren dieser Studie führen es auf eine verstärkte Aktivierung bestimmter MAP-Kinasen durch den $G_{\alpha_{q/11}}$ -Signalweg zurück. Diese MAP-Kinasen lassen sich in drei Hauptgruppen einteilen:

- Extrazellulär Signal-regulierte Kinasen (ERK)
- c-Jun NH₂-terminale Kinasen/stressaktivierte Kinasen (JNK)
- p38/HOG1 MAP-Kinasen

Während die ERK den anti-apoptotischen Signalen zugeordnet werden, gelten die JNK eher als apoptotisch. Im Falle der p38 MAP-Kinasen existieren zwei Isoformen, von denen eine, p38 α , die Apoptose fördert, während die andere, p38 β , sie inhibiert (HUNTER und CHIEN 1999; HOLLEYMAN und LARSON 2001). Den JNK wird in erster Linie für die Entstehung einer myokardialen Hypertrophie große Bedeutung beigemessen (WANG et al. 1998). Zu-

sammen mit p38-Kinasen jedoch sollen sie außerdem Signale zur Einleitung der Apoptose von Kardiomyozyten in Folge einer Drucküberlastung ebenso wie aufgrund einer Ischämie/Reperfusion weiterleiten (KAISER et al. 2004; BAINES und MOLKENTIN 2005; LOGUE et al. 2005).

Diese beiden MAP-Kinasen werden im Kardiomyozyten durch das $G\alpha_{q/11}$ -Signalprotein aktiviert; das könnte eine Erklärung für den Zusammenhang zwischen einer $G\alpha_q$ -Aktivierung und einer gesteigerten Apoptoserate darstellen (ADAMS et al. 1998; ESPOSITO et al. 2001). Allerdings konnten z. B. D'ANGELO et al. (1997) durch eine 4-fache $G\alpha_q$ -Überexpression im Herzmuskel von Mäusen zwar die Entwicklung einer dekompensierten myokardialen Hypertrophie auslösen, dabei jedoch keine erhöhten Mengen der oben genannten MAP-Kinasen nachweisen.

Ein weiterer Weg, über den das $G\alpha_{q/11}$ -Protein fördernd auf eine Apoptose von Kardiomyozyten wirken könnte, ist die mitochondriale Cytochrom c-Freisetzung. Eine vermehrte $G\alpha_q$ -Aktivierung führt zu einer verstärkten Mitochondrienschädigung und dadurch zu einer Freisetzung des Apoptose-induzierenden Proteins Cytochrom c. Die Mechanismen, die diese Mitochondrienschädigung bewirken, scheinen jedoch weitgehend ungeklärt zu sein (ADAMS et al. 2000). Allerdings gilt als erwiesen, dass die Proteinkinase Akt, ein anti-apoptotisches Enzym, das ebenfalls in den Kardiomyozyten lokalisiert ist, unter anderem über eine Stabilisierung der Mitochondrien dem programmierten Zelltod entgegenwirkt. Obgleich die genaue Wirkung des Enzyms im Kardiomyozyten nicht in vollem Umfang erforscht ist, gilt die Inhibierung des mitochondrialen Apoptosewegs als ein wichtiger Bestandteil des anti-apoptotischen Signalwegs dieser Proteinkinase (MAJEWSKI et al. 2004; UCHIYAMA et al. 2004).

Unabhängig von ihren genauen Angriffspunkten zur Inhibierung der Apoptosekaskaden jedoch ist die Proteinkinase Akt nachweislich in der Lage, den Ischämie/Reperfusionsschaden zu mindern (FUJIO et al. 2000; MATSUI et al. 2001). Neuere Studien belegen die Tatsache, dass eine Aktivierung des $G\alpha_{q/11}$ -Signalweges zu einer Abnahme der Menge an phosphoryliertem und damit aktiviertem Akt führt (BALLOU et al. 2003; HOWES et al. 2003; UEDA et al. 2004). Über die Ursache der verminderten Phosphorylierung dieses anti-apoptotischen Proteins durch das $G\alpha_{q/11}$ -Protein existieren verschiedenen Meinungen (vgl. Kap. 2.6.3): Während BALLOU et al. (2003) den Grund in einer direkten Blockade der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) sehen, dem Enzym, das die Phosphorylierung von Akt katalysiert, führen HOWES et al. (2003) Argumente für eine Verminderung eines für diese Phosphorylierung notwendigen Substrates durch den $G\alpha_q$ -Signalweg als Ursache an.

Ebenso wie die Aktivierung der oben beschriebenen MAP-Kinasen könnte die Inhibierung

des anti-apoptotischen Weges der Proteinkinase Akt durch das $G\alpha_{q/11}$ -Protein eine verminderte Empfindlichkeit der Kardiomyozyten von $G\alpha_q$ -Knockout-Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren gegenüber einer Ischämie/Reperfusion bewirken.

Diese Knockout-Tiere besitzen zwar die $G\alpha_{11}$ -Untereinheit, die im Gegensatz zum Thrombozyten im Kardiomyozyten ebenso wie $G\alpha_q$ exprimiert wird. Allerdings konnte in der Studie von OFFERMANN et al. (1998) nachgewiesen werden, dass die Kopplung bestimmter Agonisten, wie z. B. Angiotensin II, an $G\alpha_{q/11}$ -Rezeptoren bei Tieren, die nur $G\alpha_{11}$, nicht aber $G\alpha_q$ in den Herzmuskelzellen exprimieren, zu einer geringeren Calciumerhöhung in der Zelle führt als in den Kontrollgruppen. Dies zeigt, dass zwar das $G\alpha_q$ -Protein durch $G\alpha_{11}$ funktionell ersetzt werden kann, letzteres jedoch nicht in der Lage ist, das Fehlen der $G\alpha_q$ -Untereinheit quantitativ zu kompensieren.

Falls die $G\alpha_{q/11}$ -Aktivierung durch oben genannte Beeinflussung der apoptotischen und anti-apoptotischen Signalwege tatsächlich zum Ischämie/Reperfusionsschaden beiträgt, ließe sich daraus die Schlussfolgerung ziehen, dass die Kardiomyozyten der $G\alpha_q$ -Knockout-Mäuse aufgrund ihrer geringeren Aktivierbarkeit des $G\alpha_{q/11}$ -Signalweges einen gewissen Schutz gegenüber der Apoptose besäßen.

Diese Schlussfolgerung wäre jedoch nur unter der Bedingung sinnvoll, dass nach einer Ischämie/Reperfusion die $G\alpha_{q/11}$ -Untereinheit verstärkt aktiviert wird. Dafür spricht, dass z. B. Angiotensin II und Endothelin I nach einem Myokardinfarkt verstärkt im Herzmuskel gefunden werden können, wo sie an der Remodellierung des Gewebes beteiligt sind (YAMAGISHI et al. 1993; BLAUFARB und SONNENBLICK 1996; TZANIDIS et al. 2001). Diese Hormone koppeln an $G\alpha_{q/11}$ -Rezeptoren. JU et al. (1998) beschreiben darüber hinaus eine Erhöhung der $G\alpha_{q/11}$ /PLC- β -Aktivität nach einem Myokardinfarkt vor allem an den Randzonen des Infarktes. Aufgrund dieser verstärkten Aktivierung scheint es durchaus möglich, dass das $G\alpha_{q/11}$ -Protein im Kardiomyozyten den Ischämie/Reperfusionsschaden beeinflusst. Durch eine Erhöhung der Apoptoserate könnte es zu einer Vergrößerung des Infarktgebietes beitragen, die bei $G\alpha_q$ -Knockout-Tieren nicht im gleichem Ausmaß stattfinden würde.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beruht auf der Erkenntnis, dass $G\alpha_q$ -Knockout-Mäuse weniger empfindlich auf eine myokardiale Ischämie mit anschließender Reperfusion reagieren als Wildtyp-Tiere (HEUER, in Vorbereitung). Die Hypothese, dass die Ursache dafür in einer Störung der Thrombozyten-Aktivierung und einer damit verbundenen geringeren Ausprägung des Ischämie/Reperfusionsschadens liegt, konnte durch die vorliegende Arbeit jedoch weder bewiesen noch vollständig abgelehnt werden. Die Infarktgrößen unterscheiden sich nicht signifikant zwischen Tieren mit gesunden Kardiomyozyten und $G\alpha_q$ -deletierten Thrombozyten und Tieren, denen das $G\alpha_q$ -Protein in den Kardiomyozyten, nicht aber in den Thrombozyten fehlt. Aufgrund dieses Ergebnisses muss man davon ausgehen, dass der Schutz vor einer myokardialen Ischämie und Reperfusion, den Mäuse mit einem $G\alpha_q$ -Defekt offensichtlich besitzen, auf einem Mischeffekt zwischen dem Fehlen des Signalproteins in Kardiomyozyten und dessen Fehlen in Thrombozyten beruht. Dabei steht fest, dass ohne diese $G\alpha_q$ -Untereinheit die Thrombozyten-Aktivierung gestört ist und dadurch eine Beteiligung der Blutplättchen am Ischämie/Reperfusionsschaden in geringerem Ausmaße zu erwarten ist als bei Wildtyp-Tieren. Unklar ist jedoch, inwiefern der Knockout-Defekt die Kardiomyozyten direkt vor den pathologischen Veränderungen schützt, die auf den Verschluss und die anschließende Öffnung der Koronararterie folgen.

Deshalb sollten im Anschluss an diese Arbeit Untersuchungen durchgeführt werden, die gezielt darüber Aufschluss geben, ob Kardiomyozyten ohne $G\alpha_q$ -Protein prinzipiell weniger empfindlich auf eine Ischämie und/oder eine anschließende Reperfusion reagieren als Herzmuskelzellen von Wildtyp-Tieren. Zum Beispiel könnten an isolierten, einer Ischämie ausgesetzten Kardiomyozyten weiterführende Messungen bezüglich bestimmter Apoptosemarker, aber auch bezüglich bestimmter Enzym-Aktivitäten, wie z. B. der erwähnten MAP-Kinasen oder aber der Proteinkinase Akt, weiteren Aufschluss über die Ursachen einer geringeren Ausprägung des Ischämie/Reperfusionsschadens im Myokard von $G\alpha_q$ -Knockout-Tieren geben.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der Pathogenese des akuten Myokardinfarkts spielen die Thrombozyten eine wichtige Rolle. Die Thrombusbildung, die durch Aktivierung dieser Zellen in Gang gesetzt wird, resultiert in einer Okklusion der Koronararterie. Abgeschwemmte Thrombozytenemboli sind in der Lage, die Mikrozirkulation des Myokards zu beeinträchtigen. Aufgrund ihrer pro-inflammatorischen Wirkung fördern die Thrombozyten außerdem die Ausprägung des Ischämie/Reperfusionsschadens. Vorhergehende Untersuchungen von HEUER (in Vorbereitung) zeigten, dass das Myokard von $G\alpha_q$ -Knockout-Mäusen auf eine Ischämie und Reperfusion weniger empfindlich reagiert als das der Wildtyp-Mäuse. Die Aktivierung von Thrombozyten, denen das $G\alpha_q$ -Protein fehlt, ist hochgradig gestört; das führt nicht nur zu einer verstärkten Hämophilie, sondern auch zu einer reduzierten Thrombophilie der $G\alpha_q$ -Knockout-Tiere. Um herauszufinden, ob diese Störung der Thrombozyten-Aktivierung der Grund für die unterschiedliche Reaktion auf eine Ischämie/Reperfusion von $G\alpha_q$ -Knockout- und Wildtyp-Mäusen ist, wurde eine Knochenmarktransplantation durchgeführt. Dazu wurden Wildtyp-Mäuse letal bestrahlt, um die Transplantation von Knochenmarkszellen der $G\alpha_q$ -Knockout-Mäuse zu ermöglichen, während $G\alpha_q$ -Knockout-Mäuse auf diese Weise Blutzellen von Wildtyp-Tieren erhielten. Nach einer mindestens 90-tägigen Erholungsphase zur Gewährleistung einer vollständigen Rekonstitution wurden die Tiere dieser beiden Versuchsgruppen, entsprechend der Studie von HEUER (in Vorbereitung), einer 30-minütigen myokardialen Ischämie mit anschließender 24-stündiger Reperfusionsphase ausgesetzt. Sonographische Messungen prä und post operationem sollten Aufschluss über die Herzleistung geben. Am entnommenen, gefärbten Herzen wurde planimetrisch die Infarktgröße im Verhältnis zur area at risk (I/AAR) und zum linken Ventrikel (I/LV) ermittelt. Weder die Ergebnisse der Echokardiographie (relative Differenz des fractional shortening prä und post OP: $17,1 \% \pm 2,9 \%$ (SEM), versus $10,8 \% \pm 4,0 \%$ (SEM)) noch die gemessenen Infarktgrößen (I/AAR: $18,2 \% \pm 4,2 \%$ (SEM) versus $10,0 \% \pm 3,7 \%$ (SEM); I/LV: $9,5 \% \pm 2,7 \%$ (SEM) versus $5,6 \% \pm 2,2 \%$ (SEM)) unterscheiden sich signifikant zwischen den beiden Versuchsgruppen. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass für die verminderte Sensibilität der $G\alpha_q$ -Knockout-Mäuse gegenüber einer myokardialen Ischämie/Reperfusion nicht allein die gestörte Thrombozyten-Aktivierung verantwortlich ist; vielmehr scheinen zusätzlich weitere molekularbiologische Effekte, die beispielsweise das Fehlen der $G\alpha_q$ -Untereinheit im Kardiomyozyten bewirken könnte, einen gewissen Schutz vor den Pathomechanismen der Ischämie/Reperfusion darzustellen.

6 SUMMARY

Influence of the $G\alpha_q$ -protein on myocardial infarct size of the bone marrow-engrafted $G\alpha_q$ -knockout-mouse in a ischemia/reperfusion-model

Platelets play a key role in the pathogenesis of an acute myocardial infarction. Thrombus formation, which is mediated by the activation of platelets, results in the occlusion of the coronary artery. On the other hand, agglutinated platelets in the small myocardial vessels impair the myocardial microcirculation. Due to their pro-inflammatory effects, platelets also contribute to the pathogenesis of ischemia/reperfusion injury. The myocardium of $G\alpha_q$ -deficient mice showed a reduced susceptibility to ischemia and reperfusion compared to that of wild-type mice (HEUER, in preparation). Activation of platelets lacking the $G\alpha_q$ -protein is markedly impaired, resulting not only in an increased haemophilia but also in a decreased thrombophilia of $G\alpha_q$ -deficient mice. A bone marrow transplantation was performed to investigate whether the impaired platelet-activation is responsible for the reduced susceptibility of $G\alpha_q$ -deficient mice to ischemia/reperfusion injury. Wild-type mice were lethally irradiated to facilitate the engraftment of bone marrow cells of $G\alpha_q$ -deficient mice and vice versa. A reconstitution phase of at least 90 days for both groups guaranteed, that blood of wild-type mice contained normal levels of $G\alpha_q$ -deleted platelets, while blood of $G\alpha_q$ -deficient mice contained only wild-type platelets. Afterwards, according to the study of HEUER (in preparation), myocardial ischemia was artificially induced by surgically ligating the left coronary artery for 30 minutes and was followed by a reperfusion phase of 24 hours. Heart function of both groups was examined by echocardiography before and after surgery. After euthanasia the size of infarction-area to area at risk (I/AAR) and infarction-area to left ventricle (I/LV) in the stained hearts was determined by planimetry. As a result neither the cardioechography (relative difference of fractional shortening prae and post op: 17, 1 % \pm 2,9 % (SEM) versus 10,8 % \pm 4,0 % (SEM)) nor the infarct-sizes (I/AAR: 18,2 % \pm 4,2 % (SEM) versus 10,0 % \pm 3,7 % (SEM); I/LV: 9,5 % \pm 2,7 % (SEM) versus 5,6 % \pm 2,2 % (SEM)) showed any significant differences between the two groups. In conclusion it could be assumed, that the impaired platelet-activation is not the only reason for the different susceptibility of wild-type and $G\alpha_q$ -deficient mice to ischemia/reperfusion injury; in fact, the reduced susceptibility of $G\alpha_q$ -deficient mice seems to be a result of both - their impaired platelet-activation and unknown protecting effects based on the absence of the $G\alpha_q$ -protein in other cells such as cardiomyocytes.

7 LITERATURVERZEICHNIS

ADAMS JW, SAKATA Y, DAVIS MG, SAH VP, WANG Y, LIGGETT SB, CHIEN KR, BROWN JH, DORN GW 2nd (1998)

Enhanced G_{α_q} signaling: A common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure.

Proc Natl Acad Sci U S A; 95: 10140-10145

ADAMS JW, PAGEL AM, MEANS CK, OKSENBERG D, ARMSTRONG RC, BROWN JH (2000)

Cardiomyocyte apoptosis induced by G_{α_q} signaling is mediated by permeability transition pore formation and activation of the mitochondrial death pathway.

Circ Res; 87: 1180-1187

ADLER SS (1984)

Hemopoietic reconstitution of marrow and spleens in mice after whole-body irradiation and marrow transplantation.

Transplantation; 37: 517-520

AHN D, CHENG L, MOON C, SPURGEON H, LAKATTA EG, TALA MI (2004)

Induction of myocardial infarcts of a predictable size and location by branch pattern probability-assisted coronary ligation in C57BL/6 mice.

Am J Physiol Heart Circ Physiol; 286: H1201-1207

AKTHER SA, LUTTRELL LM, ROCKMAN HA, IACCARINO G, LEFKOWITZ RJ, KOCH WJ (1998)

Targeting the receptor- G_{α_q} interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy.

Science; 280: 574-577

ANDREWS RK, GARDINER EE, SHEN Y, BERNDT MC (2004)

Platelet interactions in thrombosis.

IUBMB Life; 56: 13-18

ARAGAY AM, KATZ A, SIMON MI (1992)

The G_{α_q} and $G_{\alpha_{11}}$ proteins couple the thyrotropin-releasing hormone receptor to phospholipase C in GH₃ pituitary cells.

J Biol Chem; 267: 24983-24988

ASKENASY N, STEIN J, YANIV I, FARKAS DL (2003)

The topologic and chronologic patterns of hematopoietic cell seeding in host femoral bone marrow after transplantation.

Biol Blood Marrow Transplant; 9: 496-504

BAI H, WU LL, XING DQ, LIU J, ZHAO YL (2004)

Angiotensin II induced upregulation of $G_{\alpha_{q/11}}$, phospholipase C β_3 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 via angiotensin II type 1 receptor.

Chin Med J; 117: 88-93

BAINES CP, MOLKENTIN JD (2005)

Stress signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis.

J Mol Cell Cardiol; 38: 47-62

BAKER GR, SULLAM PM, LEVIN J (1997)

A simple, fluorescent method to internally label platelets suitable for physiological measurements.

Am J Hematol; 56: 17-25

BALLOU LM, LIN HY, FAN G, JIANG YP, LIN RZ (2003)

Activated G_{α_q} inhibits p110 α Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt.

J Biol Chem; 278: 23472-23479

BAPTISTA CA, DiDIO LJ, PRATES JC (1991)

Types of division of the left coronary artery and the ramus diagonalis of the human heart.

Jpn Heart J; 32: 323-335

BERNDT MC, SHEN Y, DOPHEIDE SM, GARDINER EE, ANDREWS KA (2001)

The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex.

Thromb Haemost; 86: 178-188

BLANKS JE, MOLL T, EYTNER R, VESTWEBER D (1998)

Stimulation of P-selectin glycoprotein ligand-1 on mouse neutrophils activates β_2 -integrin mediated cell attachment to ICAM-1.

Eur J Immunol; 28: 433-443

BLAUFARB IS, SONNENBLICK EH (1996)

The renin-angiotensin system in left ventricular remodeling.

Am J Cardiol; 77: 8C-16C

BOCKAERT J, PIN JP (1999)

Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success.

EMBO J; 18: 1723-1729

BOMBELI T, SCHWARTZ BR, HARLAN JM (1998)

Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), $\alpha_v\beta_3$ integrin, and GPIb α .

J Exp Med; 187: 329-339

BRADFORD G, WILLIAMS N, BARBER L, BERTINCELLO I (1993)

Temporal thrombocytopenia after engraftment with defined stem cells with long-term marrow reconstituting activity.

Exp Hematol; 21: 1615-1620

BRANDT E, PETERSEN F, LUDWIG A, EHLERT JE, BOCK L, FLAD HD (2000)

The β -thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation.

J Leukoc Biol; 67: 471-478

BRASS LF, MANNING DR, CICHOWSKI K, ABRAMS CS (1997)

Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond.

Thromb Haemost; 78: 581-589

BRAUNWALD E, KLONER RA (1982)

The stunned myocardium: prolonged postischemic ventricular dysfunction.
Circulation; 66: 1146-1149

CHAMBERS DE, PARKS DA, PATTERSON G, ROY R, McCORD JM, YOSHIDA S,
PARMLEY LF, DOWNEY JM (1985)

Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia.
J Mol Cell Cardiol; 17: 145-152

CONSTANTINIDES P (1966)

Plaque fissuring in human coronary thrombosis.
J Atheroscler Res 6: 1-17

CUI J, WAHL RL, SHEN T, FISHER SJ, RECKEER E, GINSBURG D, LONG MW (1999)

Bone marrow cell trafficking following intravenous administration.
Br J Haematol; 107: 895-902

CUI YZ, HISHA H, YANG GX, FAN TX, JIN T, LI Q, LIAN Z, IKEHARA S (2002)

Optimal protocol for total body irradiation for allogeneic bone marrow transplantation in mice.
Bone Marrow Transplant; 30: 843-849

DAVIES MJ, THOMAS A (1984)

Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death.
N Engl J Med; 310: 1137-1140

DAVIES MJ, THOMAS AC, KNAPMAN PA, HANGARTNER JR (1986)

Intramyocardial platelet aggregation in patients with unstable angina suffering sudden
ischemic cardiac death.
Circulation; 73: 418-427

D'ANGELO DD, SAKATA Y, LORENZ JN, BOIVIN GP, WALSH RA, LIGGETT SB,
DORN GW 2nd (1997)

Transgenic G α_q overexpression induces cardiac contractile failure in mice.
Proc Natl Acad Sci U S A; 94: 8121-8126

DOHLMAN HG, BOUVIER M, BENOVIC JL, CARON MG, LEFKOWITZ RJ (1987)

The multiple membrane spanning topography of the β_2 -adrenergic receptor.
J Biol Chem; 262: 14282-14288

DOWN JD, TARBELL NJ, THAMES HD, MAUCH PM (1991)

Syngeneic and allogeneic bone marrow engraftment after total body irradiation: dependence
on dose, dose rate, and fractionation.
Blood; 77: 661-669

EI-MARAGHI N, GENTON E (1980)

The relevance of platelet and fibrin thromboembolism of the coronary microcirculation, with
special reference to sudden cardiac death.
Circulation; 62: 936-944

ENGLER RL, DAHLGREN MD, MORRIS DD, PETERSON MA,
SCHMID-SCHONBEIN GW (1986)

Role of leucocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs.
Am J Physiol; 251: H314-323

ENTMANN ML, YOUKER KA, FRANGOIANNIS N, LAKSHMINARAYANAN V,
NOSSULI T, EVANS A, KURRELMAYER K, MANN DL, SMITH CW (2000)

Is inflammation good for the ischemic heart - perspectives beyond the ordinary.
Z Kardiol; 89 Suppl 9: IX/82-87

ESPOSITO G, PRASAD SV, RAPACCIUOLO A, MAO L, KOCH WJ,
ROCKMAN HA (2001)

Cardiac overexpression of a $G\alpha_q$ inhibitor blocks induction of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH₂-terminal kinase activity in in vivo pressure overload.
Circulation; 103: 1453-1458

EVANGELISTA V, MANARINI S, ROTONDO S, MARTELLI N, POLISCHUK R,
McGREGOR JL, de GAETANO G, CERLETTI C (1996)

Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the $\beta 2$ integrin CD11b/CD18.
Blood; 88: 4183-4194

EVANGELISTA V, MANARINI S, SIDERI R, ROTONDO S, MARTELLI N, PICCOLI A,
TOTANI L, PICCARDONI P, VESTWEBER D, de GAETANO G, CERLETTI C (1999)

Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule.
Blood; 93: 876-885

FALK E (1983)

Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi.
Br Heart J; 50: 127-134

FALK E (1985)

Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death. Autopsy evidence of recurrent mural thrombosis with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion.
Circulation; 71: 699-708

FERRARI R, CECONI C, CURELLO S, GUARNIERI C, CALDARERA CM,
ALBERTINI A, VISIOLI O (1985)

Oxygen-mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion: role of the cellular defences against oxygen toxicity.
J Mol Cell Cardiol; 17: 937-945

FISHBEIN MC, MEERBAUM S, RIT JACOB, LANDO U, KANMATSUSE K, MERCIER
JC, CORDAY E, GANZ W (1981)

Early phase acute myocardial infarct size quantification: Validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique.
Am Heart J; 101: 593-600

- FORMAN MB, VIRMANI R, PUETT DW (1990)
Mechanism and therapy of myocardial reperfusion injury.
Circulation 81(3 Suppl): IV 69-78
- FRANGOIANNIS NG, SMITH CW, ENTMANN ML (2002)
The inflammatory response in myocardial infarction.
Cardiovasc Res; 53: 1-47
- FRIDOVICH I (1983)
Superoxid radical: an endogenous toxicant.
Annu Rev Pharmacol Toxicol; 23: 239-257
- FUJIO Y, NGUYEN T, WENCKER D, KITSIS RN, WALSH K (2000)
Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart.
Circulation; 101: 660-667
- GACHET, C (2001)
ADP receptors of platelets and their inhibition.
Thromb Haemost; 86: 222-232
- GAWAZ M, NEUMANN FJ, DICKFELD T, REININGER A, ADELSBERGER H, GEBHARDT A, SCHÖMIG A (1997)
Vitronectin receptor ($\alpha_v\beta_3$) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction.
Circulation; 96: 1809-1818
- GAWAZ M (1999)
Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung.
G. Thieme-Verlag, Stuttgart; New York
- GAWAZ M (2004)
Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium.
Cardiovasc Res; 61: 498-511
- GOLDBOURT U, NEUFELD HN (1986)
Genetic aspects of arteriosclerosis.
Arteriosclerosis; 6: 357-377
- GORDON DJ, RIFKIND BM (1989)
High-density lipoprotein – the clinical implications of recent studies.
N Engl J Med; 321: 1311-1616
- GOTTLIEB RA, BURLESON KO, KLONER RA, BABIOR BM, ENGLER RL (1994)
Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes.
J Clin Invest; 94: 1621-1628
- GU JL, MÜLLER S, MANCINO V, OFFERMANN S, SIMON MI (2002)
Interaction of $G\alpha_{12}$ with $G\alpha_{13}$ and $G\alpha_q$ signaling pathways.
Proc Natl Acad Sci U S A; 99: 9352-9357

- HACKETT D, McKENNA W, DAVIES G, MASERI A (1990)
Reperfusion arrhythmias are rare during acute myocardial infarction and thrombolysis in man.
Int J Cardiol; 29: 205-213
- HANSEN PR (1998)
Inflammatory alterations in the myocardial microcirculation.
J Mol Cell Cardiol; 30: 2555-2559
- HARKEN AH, SIMSON MB, HASELGROVE J, WETSTEIN L, HARDEN WR 3rd,
BARLOW CH (1981)
Early ischemia after complete coronary ligation in the rabbit, dog, pig and monkey.
Am J Physiol; 241: H202-210
- HARRISON P, CRAMER EM (1993)
Platelet alpha-granules.
Blood Rev; 7: 52-62
- HARTMANN J, BLUM R, KOVALCHUK Y, ADELSBERGER H, KUNER R, DURAND
GM, MIYATA M, KANO M, OFFERMANN S, KONNERTH A (2004)
Distinct roles of $G\alpha_q$ and $G\alpha_{11}$ for Purkinje cell signaling and motor behavior.
J Neurosci; 24: 5119-5130
- HAWRYLOWICZ CM, HOWELLS GL, FELDMANN M (1991)
Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and
cytokine production.
J Exp Med; 174: 785-790
- HEARSE DJ, MAXWELL L, SALDANHA C, GAVIN JB (1993)
The myocardial vasculature during ischemia and reperfusion: a target for injury and
protection.
J Mol Cell Cardiol; 25: 759-800
- HEIN L, STEVENS ME, BARSH GS, PRATT RE, KOBILKA BK, DZAU VJ (1997)
Overexpression of angiotensin AT₁ receptor transgene in the mouse myocardium produces a
lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block.
Proc Natl Acad Sci U S A; 94: 6391-6396
- HENKE J, ERHARDT W (2004)
Nager
In: ERHARDT W, HENKE J, HABERSTROH J (Hrsg)
Anästhesie und Analgesie bei Klein- und Heimtieren
Schattauer, Stuttgart, New York: 642-663
- HENN V, SLUPSKY JR, GRÄFE M, ANAGNOSTOPOULOS I, FÖRSTER R, MÜLLER-
BERHAUS G, KROCZEK RA (1998)
CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells.
Nature; 391: 591-594

- HEPLER JR, KOZASA T, SMRCKA AV, SIMON MI, RHEE SG, STERNWEIS PC, GILMAN AG (1993)
Purification from Sf9 cells and characterisation of recombinant $G\alpha_q$ and $G\alpha_{11}$. Activation of purified phospholipase C isozymes by $G\alpha$ subunits.
J Biol Chem; 268: 14367-14375
- HESS ML, MANSON NH (1984)
Molecular oxygen: friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury.
J Mol Cell Cardiol; 16: 969-985
- HEUER M (in Vorbereitung)
Myokardialer Ischämie/Reperfusionsschaden am Modell der $G\alpha_q$ -Knockout-Maus.
Veterinärmedizinische Dissertation, München
- HOLLEYMAN CR, LARSON DF (2001)
Apoptosis in the ischemic reperfused myocardium.
Perfusion; 16: 491-502
- HOSTMARK AT, OSLAND A, SIMONSEN S, LEVORSTAD K (1990)
Lipoprotein-related coronary risk factors in patients with angiographically defined coronary artery disease: relation to number of stenosed arteries.
J Intern Med; 228: 317-321
- HOWES AL, ARTHUR JF, ZHANG T, MIYAMOTO S, ADAMS JW, DORN GW 2nd, WOODCOCK EA, BROWN JH (2003)
Akt-mediated cardiomyocyte survival pathways are compromised by $G\alpha_q$ -induced phosphoinositide 4,5-bisphosphate depletion.
J Biol Chem; 278: 40343-40351
- HUNTER JJ, CHIEN KR (1999)
Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure.
N Engl J Med; 341: 1276-1283
- ICARDO JM, COLVEE E (2001)
Origin and course of the coronary arteries in normal mice and in iv/iv mice.
J Anat; 199: 473-482
- JACKSON SP, NESBITT WS, KULKARNI S (2003)
Signaling events underlying thrombus formation.
J Thromb Haemost; 1: 1602-1612
- JENNINGS RB, SOMMERS HM, SMYTH GA, FLACK HA, LINN H (1960)
Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog.
Arch Pathol; 70: 68-78
- JENNINGS RB, REIMER KA, HILL ML, MAYER SE (1981)
Total ischemia in dog hearts, in vitro. 1. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletion, and adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs. severe ischemia in vivo.
Circ Res; 49: 892-900

- JOHNSON GL, LEIS LA, DUNLOP PC (1996)
Specificity of $G\alpha_q$ and $G\alpha_{11}$ gene expression in platelets and erythrocytes. Expressions of cellular differentiation and species differences.
Biochem J; 318: 1023-1031
- JU H, ZHAO S, TAPPIA PS, PANAGIA V, DIXON IM (1998)
Expression of $G\alpha_q$ and PLC- β in scar and border tissue in heart failure due to myocardial infarction.
Circulation; 97: 892-899
- KAISER RA, BUENO OF, LIPS DJ, DOEVENDANS PA, JONES F, KIMBALL TF, MOKKENTIN JD (2004)
Targeted inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase antagonizes cardiac injury and cell death following ischemia-reperfusion in vivo.
J Biol Chem; 279: 15524-15530
- KLAGES B, BRANDT U, SIMON MI, SCHULTZ G, OFFERMANN S (1999)
Activation of G_{12}/G_{13} results in shape changes and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets.
J Cell Biol; 144: 745-754
- KLINGER MH, JELKMANN W (2002)
Role of blood platelets in infection and inflammation.
J Interferon Cytokine Res; 22: 913-922
- KLONER RA, GANOTE CE, JENNINGS RB (1974)
The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog.
J Clin Invest; 54: 1496-1508
- KOGAKI S, SAWA Y, SANO T, MATSUSHITA T, OHATA T, KUROTOBI S, TOJO SJ, MATSUDA H, OKADA S (1999)
Selectin on activated platelets enhances neutrophil endothelial adherence in myocardial reperfusion injury.
Cardiovasc Res; 43: 968-973
- KROLL MH, SCHAFER AI (1989)
Biochemical mechanisms of platelet activation.
Blood; 74: 1181-1195
- KRUG A, Du MESNIL De ROCHEMONT, KORB G (1966)
Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion.
Circ Res; 19: 57-62
- KUPATT C, HABAZETTL H, HANUSCH P, WICHELS R, HAHNEL D, BECKER BF, BOEKSTEGERS P (2000)
C7E3Fab reduces postischemic leukocyte-thrombocyte interaction mediated by fibrinogen. Implications for myocardial reperfusion injury.
Arterioscler Thromb Vasc Biol; 20: 2226-2232

- KUPATT C, WICHELS R, HORSTKOTTE J, KROMBACH F, HABAZETTL H, BOEKSTEGERS P (2002)
Molecular mechanisms of platelet-mediated leukocyte recruitment during myocardial reperfusion.
J Leukoc Biol; 72: 455-461
- KUSUOKA H, KORETSUNE Y, CHACKO VP, WEISFELDT ML, MARBAN E (1990)
Excitation-contraction coupling in postischemic myocardium. Does failure of activator Ca^{2+} transients underlie stunning?
Circ Res; 66: 1268-1276
- LABERGE S, CRUIKSHANK WW, BEER DJ, CENTER DM (1996)
Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8^{+} T cells in vitro.
J Immunol; 156 310-315
- LECUT C, SCHOOLMEESTER A, KUIJPERS MJ, BROERS JL, van ZANDVOORT MA, VANHOORELBEKE K, DECKMYN H, JANDROT-PERRUS M, HEEMSKERK JW (2004)
Principal role of glycoprotein VI in $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha \text{IIb}\beta 3$ activation during collagen-induced thrombus formation.
Arterioscler Thromb Vasc Biol; 24: 1727-1733
- LEE CH, PARK D, WU D, RHEE SG, SIMON MI (1992)
Members of the $\text{G}\alpha_q$ subunit gene family activate phospholipase C β isoenzymes.
J Biol Chem; 267: 16044-16047
- LEFER AM, CAMPBELL B, SCALIA R, LEFER DJ (1998)
Synergism between platelets and neutrophils in provoking cardiac dysfunction after ischemia and reperfusion: role of selectins.
Circulation; 98: 1322-1328
- LIN MC, ROCKMAN HA, CHIEN KR (1995)
Heart and lung disease in engineered mice.
Nat Med; 1: 749-751
- LOGUE SE, GUSTAFSSON AB, SAMALI A, GOTTLIEB RA (2005)
Ischemia/reperfusion injury at the intersection with cell death.
J Mol Cell Cardiol; 38: 21-33
- LUM H, BARR DA, SHAFFER JR, GORDON RJ, EZRIN AM, MALIK AB (1992)
Reoxygenation of endothelial cells increases permeability by oxidant-dependent mechanisms.
Circ Res; 70: 991-998
- LUSIS AJ (2000)
Atherosclerosis.
Nature; 407: 233-241
- LUTTERLL LM (2002)
Activation and targeting of mitogen-activated protein-kinases by G-protein-coupled receptors.
Can J Physiol Pharmacol; 80: 375-382

- MACH F, SCHONBECK U, BONNEFOY JY, POBER JS, LIBBY P (1997)
Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor.
Circulation; 96: 396-399
- MAJEWSKI N, NOGUEIRA V, ROBEY RB, HAY N (2004)
Akt inhibits apoptosis downstream of BID cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases.
Mol Cell Biol; 24: 730-740
- MANNING KL, McDONALD TP (1997)
C3H mice have larger spleens, lower platelet counts, and shorter platelet lifespans than C57BL mice: An animal model for the study of hypersplenism.
Exp Hematol; 25: 1019-1024
- MASSBERG S, ENDERS G, LEIDERER R, EISENMENGER S, VESTWEBER D, KROMBACH F, MESSMER K (1998)
Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion. The role of P-selectin.
Blood; 92: 507-512
- MASSBERG S, ENDERS G, MATOS FC, TOMIC LI, LEIDERER R, EISENMENGER S, MESSMER K, KROMBACH F (1999)
Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo.
Blood; 94: 3829-3838
- MASSBERG S, GAWAZ M, GRÜNER S, SCHULTE V, KONRAD I, ZOLNHÖFER D, HEINZMANN U, NIESWANDT B (2003)
A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo.
J Exp Med; 197: 41-49
- MATSUI T, TAO J, del MONTE F, LEE KH, LI L, PICARD M, FORCE TL, FRANKE TF, HAJJAR RJ, ROSENZWEIG A (2001)
Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo.
Circulation; 104: 330-335
- MAXWELL SR, LIP GY (1997)
Reperfusion injury. A review of the pathophysiology, clinical manifestation and therapeutic options.
Int J Cardiol; 58: 95-117
- McALPINE WA (1975)
The branches of the coronary arteries.
In: MC ALPINE WA (Ed) Heart and coronary arteries
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg: 163-178
- McCORD JM, FRIDOVICH I (1978)
The biology and pathology of oxygen radicals.
Ann Intern Med; 89: 122-127

McCORD JM (1985)

Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury.

N Engl J Med 312: 159-163

MENDE U, KAGEN A, COHEN A, ARAMBURU J, SCHOEN FJ, NEER EJ (1998)

Transient cardiac expression of constitutively active G_{α_q} leads to hypertrophy and dilated cardiomyopathy by calcineurin-dependent and independent pathways.

Proc Natl Acad Sci U S A; 95: 13893-13898

MICHAEL LH, ENTMAN ML, HARTLEY GJ, YOUKER KA, ZHU J, HALL SR,

HAWKINS HK, BERENS K, ALLANTYNE CM (1995)

Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model.

Am J Physiol; 269: H2147-2154

MIKI T, LIU GS, COHEN MV, DOWNEY JM (1998)

Mild hypothermia reduces infarct size in the beating rabbit heart: A practical intervention for acute myocardial infarction?

Basic Res Cardiol; 93: 372-383

MILANO CA, DOLBER PC, ROCKMAN HA, BOND RA, VENABLE MD, ALLEN LF, LEFKOWITZ RJ (1994)

Myocardial expression of a constitutively active α_{1B} -adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy.

Proc Natl Acad Sci U S A; 91: 10109-10113

MILLER SC (2002)

Hematopoietic reconstitution of irradiated, stem cell-injected mice: early dynamics of restoration of the cell lineages of the spleen and bone marrow.

J Hematother Stem Cell Res; 11: 965-970

MILLIGAN G, MULLANEY I, McCALLUM JF (1993)

Distribution and relative levels of expression of the phosphoinositidase-C-linked G-proteins $G_{q\alpha}$ and $G_{11\alpha}$ absence of $G_{11\alpha}$ in human platelets and haemopoietically derived cell lines.

Biochim Biophys Acta; 1179: 208-212

MOERS A, WETTSCHURECK N, GRÜNER S, NIESWANDT B, OFFERMANN S (2004)

Unresponsiveness of platelets lacking both G_{α_q} and $G_{\alpha_{13}}$. Implications for collagen-induced platelet activation.

J Biol Chem; 279: 45354-45359

MURAMATSU K, BISHOP AT, SUNAGAWA T, VALENZUELA RG (2003)

Fate of donor cells in vascularized bone grafts: identification of systemic chimerism by the polymerase chain reaction.

Plast Reconstr Surg; 111: 763-772

MURUGAPPAN S, SHANKAR H, KUNAPULI SP (2004)

Platelet receptors for adenine nucleotides and thromboxane A_2 .

Semin Thromb Hemost; 30: 411-418

NAYLER WG, ELZ JS (1986)

Reperfusion injury: laboratory artifact or clinical dilemma?

Circulation 74: 215-221

NEVES SR, RAM PT, IYENGAR R (2002)

G protein pathways.

Science; 296: 1636-1639

NISHIJIMA K, KIRYU J, TSUJIKAWA A, MIYAMOTO K, HONJO M, TANIHARA H, NONAKA A, YMASHIRO K, KATSUTA H, MIYAHARA S, HONDA Y, OGURA Y (2004)

Platelets adhering to the vascular wall mediate postischemic leukocyte-endothelial cell interactions in retinal microcirculation.

Invest Ophthalmol Vis Sci; 45: 977-984

NIESWANDT B, SCHULTE V, ZYWIETZ A, GRATACAP MP, OFFERMANN S (2002)

Costimulation of G_i and G_{12}/G_{13} -mediated signaling pathways induces Integrin $\alpha IIb\beta 3$ activation in platelets.

J Biol Chem; 277: 39493-39498

OFFERMANN S, LAUGWITZ KL, SPICHER K, SCHULTZ G (1994a)

G proteins of the G_{12} family are activated via thromboxane A_2 and thrombin in human platelets.

Proc Natl Acad Sci U S A; 91: 504-508

OFFERMANN S, HEILER E, SPICHER K, SCHULTZ G (1994b)

G_q and G_{11} are concurrently activated by bombesin and vasopressin in Swiss 3T3 cells.

FEBS Lett; 349: 201-204

OFFERMANN S, HASHIMOTO K, WATANABE M, SUN W, KURIHARA H, THOMPSON RF, INOUE Y, KANO M, SIMON MI (1997a)

Impaired motor coordination and persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking $G\alpha_q$.

Proc Natl Acad Sci U S A; 94: 14089-14094

OFFERMANN S, TOOMBS C, HU YH, SIMON MI (1997b)

Defective platelet activation in $G\alpha_q$ -deficient mice.

Nature; 389: 183-186

OFFERMANN S, ZHAO LP, GOHLA A, SAROSI I, SIMON MI, WILKIE TM (1998)

Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -mutant mice.

EMBO J; 17: 4304-4312

OFFERMANN S (2000)

The role of heterotrimeric G proteins in platelet activation.

Biol Chem; 381: 389-396

OFFERMANN S (2003)

G-proteins as transducers in transmembran signaling.

Prog Biophys Mol Biol; 83: 101-130

- OHLMANN P, ECKLY A, FREUND M, CAZENAVE JP, OFFERMANN S, GACHET C (2000)
ADP induces partial platelet aggregation without shape change and potentiates collagen-induced aggregation in the absence of G_{α_q} .
Blood; 96: 2134-2139
- PAIGEN K (1995)
A miracle enough: the power of mice.
Nat Med; 1: 215-220
- PATEL D, VAANANEN H, JIROUSKOVA M, HOFFMANN T, BODIAN C, COLLIER BS (2003)
Dynamics of GPIIb/IIIa-mediated platelet-platelet interactions in platelet/thrombus formation on collagen in vitro as revealed by videomicroscopy.
Blood; 101: 929-936
- PATTEN RD, ARONOVITZ MJ, DERAS-MEJIA L, PANDIAN NG, HANAK GG, SMITH JJ, MENDELSON ME, KONSTAM MA (1998)
Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction.
Am J Physiol; 274: H1812-1820
- PETERS SO, BAUERMEISTER K, SIMON JP, BRANKE B, WAGNER T (2002)
Quantitative polymerase chain reaction-based assay with fluorogenic Y-chromosome specific probes to measure bone marrow chimerism in mice.
J Immunol Methods; 260: 109-116
- PETRY F, BOTTO M, HOLTAPPELS R, WALPORT MJ, LOOS M (2001)
Reconstitution of the complement function in C1q-deficient ($C1qa^{-/-}$) mice with wild-type bone marrow cells.
J Immunol; 167: 4033-4037
- POWER CA, CLEMETSON JM, CLEMETSON KJ, WELLS TN (1995)
Chemokine and chemokine receptor mRNA expression in human platelets.
Cytokine; 7: 479-482
- QUINTON TM, MURUGAPPAN S, KIM S, JIN J, KUNAPULI SP (2004)
Different G protein-coupled signaling pathways are involved in α granule release from human platelets.
J Thromb Haemost; 2: 978-984
- REIMER KA, JENNINGS RB (1992)
Myocardial Ischemia, Hypoxia and Infarction
In: FOZZARD HA, HABER E, JENNINGS RB, KATZ AM, MORGAN HE, editors.
The heart and cardiovascular system. New York: Raven Press, 1992: 1875-1973
- RENDU F, BROHARD-BOHN B (2001)
The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions.
Platelets; 12: 261-273

RIEDE UN, DREXLER H (1999)

Herzleistungsstörungen.

In: RIEDE UN, SCHAEFER HE (Eds.), Allgemeine und spezielle Pathologie, 4. Aufl., G. Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, 480-495

RIEDE UN, SCHAEFER HE (1999)

Letale Zellschädigung.

In: RIEDE UN, SCHAEFER HE (Eds.), Allgemeine und spezielle Pathologie, 4. Aufl., G. Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, 135-144

RODBELL M, BIRNBAUMER L, POHL SL, KRANS HM (1971)

The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action.

J Biol Chem; 246: 1877-1882

RODERICK TH (1963)

The Response of twenty-seven inbred strains of mice to daily doses of whole-body X-irradiation.

Radiat Res; 20: 631-639

ROTH GJ (1991)

Developing relationships: arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib, and leucin-rich glycoproteins.

Blood; 77: 5-19

RUGGERI ZM (2004)

Platelet and von Willebrand factor interactions at the vessel wall.

Hämostaseologie; 24: 1-11

SAKATA Y, HOIT BD, LIGGETT SB, WALSH RA, DORN GW 2nd (1998)

Decompensation of pressure-overload hypertrophy in $G\alpha_q$ -overexpressing mice.

Circulation; 97: 1488-1495

SALOMON O, LAPIDOT T, TERENCE A, LUBIN I, RABI I, REISNER Y (1990)

Induction of donor-type chimerism in murine recipients of bone marrow allografts by different radiation regimes currently used in treatment of leukaemia patients.

Blood; 76: 1872-1878

SALTO-TELLEZ M, YUNG LIM S, EL-OAKLEY RM, TANG TP, ALMSHERQI ZA, LIM SK (2004)

Myocardial infarction in the C57BL/6J mouse. A quantifiable and highly reproducible experimental model.

Cardiovasc Pathol; 13: 91-97

SANDLER JA, CLYMAN RI, MANGANIELLO VC, VAUGHAN M (1975)

The effect of serotonin (5-hydroxytryptamine) and derivatives on guanosine 3',5'-monophosphate in human monocytes.

J Clin Invest; 55: 431-435

SAVAGE B, ALMUS-JACOBS F, RUGGERI ZM (1998)

Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow.

Cell; 94: 657-666

SCHAPER W, De BRABANDER M, LEWI P (1971)

DNA synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog.

Circ Res; 28: 671-679

SCHENK BI, PETERSEN F, FLAD HD, BRANDT E (2002)

Platelet-derived chemokines CXC chemokine ligand (CXCL)7, connective tissue-activating peptide III, and CXCL4 differentially affect and cross-regulate neutrophil adhesion and transendothelial migration.

J Immunol; 169: 2602-2610

SCHERRER-CROSBIE M, STEUDEL W, HUNZIKER PR, LIEL-COHEN N, ULLRICH R, ZAPOL WM, PICARD MH (1999)

Three-dimensional echocardiographic assessment of left ventricular wall motion abnormalities in mouse myocardial infarction.

J Am Soc Echocardiogr; 12: 834-840

SCHMITT A, GUICHARD J, MASSE JM, DEBILI N, CRAMER EM (2001)

Of mice and men: comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets.

Exp Hematol; 29: 1295-1302

SCHUMMER A (1984)

Organe des Kreislaufes, Herz

In: NICKEL R, SCHUMMER A, SEIFERLE E (Eds.), Lehrbuch der Anatomie der Haustiere 2. Aufl., Paul Parey, Berlin, 17-75

SELIGMANN C, LEITSCH T, KUSUS M, BOCK A, SCHIMMER M, SIMSEK Y, DANIEL WG (2003)

PMN/platelets coinfused in guinea pig hearts exposed to low-flow ischemia have no additive cardiodepressive effect.

J Vasc Res; 40: 501-508

SHARMA HS, WUNSCH M, BRAND T, VERDUOW PD, SCHAPER W (1992)

Molecular biology of the coronary vascular and myocardial responses to ischemia.

J Cardiovasc Pharmacol; 20 Suppl 1: S23-31

SIMON MI, STRATHMANN MP, GAUTAM N (1991)

Diversity of G proteins in signaling transduction.

Science; 252: 802-808

SKORSKI T, KAWALEC M, HOSER G, RATAJCZAK M, GNATOWSKI B, KAWIAK J (1988)

The kinetics of immunologic and hematologic recovery in mice after lethal total body irradiation and reconstitution with syngeneic bone marrow cells treated or untreated with mafosfamide (ASTA Z 7654).

Bone Marrow Transplant; 3: 543-551

- SLAYTON WB, GEORGELAS A, PIERCE LJ, ELENITOBA-JOHNSON KS, PERRY SS, MARX M, SPANGRUDE GJ (2002)
The spleen is a major site of megakaryopoiesis following transplantation of murine hematopoietic stem cells.
Blood; 100: 3975-3982
- SMITH LG, WEISSMAN IL, HEIMFELD S (1991)
Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation in vivo.
Proc Natl Acad Sci U S A; 88: 2788-2792
- SPANGRUDE GJ, HEIMFELD S, WEISSMAN IL (1988)
Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells.
Science; 241: 58-62
- STRATHMANN M, SIMON MI (1990)
G protein diversity: a distinct class of α subunits is present in vertebrates and invertebrates.
Proc Natl Acad Sci U S A; 87: 9113-9117
- SUEHIRO K, TAKUMA S, SHIMIZU J, HOZUMI T, YANO H, CARDINALE C, DiTULLIO MR, WANG J, SMITH CR, BURKHOFF D, HOMMA S (2001)
Assessment of left ventricular systolic function using contrast two-dimensional echocardiography with a high-frequency transducer in the awake murine model of myocardial infarction.
Jpn Circ J; 65: 979-83.
- TANAKA J, NAKAGAWA S, KUSHIYA E, YAMASAKI M, FUKAYA M, IWANAGA T, SIMON MI, SAKIMURA K, KANO M, WATANABE M (2000)
 G_q protein α subunits G_{α_q} and $G_{\alpha_{11}}$ are localized at postsynaptic extra-junctional membrane of cerebellar Purkinje cells and hippocampal pyramidal cells.
Eur J Neurosci; 12: 781-792
- TANAKA K, LUDWIG LM, KROLIKOWSKI JG, ALCINDOR D, PRATT PF, KERSTEN JR, PAGEL PS, WARLTIER DC (2004)
Isoflurane produces delayed preconditioning against myocardial ischemia and reperfusion injury: role of cyclooxygenase-2.
Anesthesiology; 100: 525-531
- TESHIMA Y, AKAO M, JONES SP, MARBAN E (2003)
Cariporide (HOE642), a selective Na^+-H^+ exchange inhibitor, inhibits the mitochondrial death pathway.
Circulation; 108: 2275-2281
- TÖNDURY G (1981)
Herz und Herzbeutel.
In: TÖNDURY G: Angewandte und topographische Anatomie, 5. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 51-78
- TOMITA Y, SACHS DH, SYKES M (1994)
Myelosuppressive conditioning is required to achieve engraftment of pluripotent stem cells contained in moderate doses of syngeneic bone marrow.
Blood; 83: 939-948

- TZANIDIS A, LIM S, HANNAN RD, SEE F, UGONI AM, KRUM H (2001)
Combined angiotensin and endothelin receptor blockade attenuates adverse cardiac remodeling post-myocardial infarction in the rat: possible role of transforming growth factor β_1 .
J Mol Cell Cardiol; 33: 969-981
- UCHIDA N, FLEMING WH, ALPERN EJ, WEISSMAN IL (1993)
Heterogeneity of hematopoietic stem cells.
Curr Opin Immunol; 5: 177-184
- UCHIDA N, AGUILA HL, FLEMING WH, JERABEK L, WEISSMAN IL (1994)
Rapid and sustained hematopoietic recovery in lethally irradiated mice transplanted with purified Thy-1.1^{lo} Lin⁻Sca-1⁺ hematopoietic stem cells.
Blood; 83: 3758-3779
- UCHIYAMA T, ENGELMAN RM, MAULIK N, DAS DK (2004)
Role of Akt signaling in mitochondrial survival pathway triggered by hypoxic preconditioning.
Circulation; 109: 3042-3049
- UEDA H, MORISHITA R, NARUMIYA S, KATO K, ASANO T (2004)
 $G_{\alpha_{q/11}}$ signaling induces apoptosis through two pathways involving reduction of Akt phosphorylation and activation of RhoA in HeLa cells.
Exp Cell Res; 298: 207-217
- VANDEN HOEG TL, SHAO Z, LI C, SCHUMACKER PT, BECKER LB (1997)
Mitochondrial electron transport can become a significant source of oxidative injury in cardiomyocytes.
J Mol Cell Cardiol; 29: 2441-2450
- VERDOUW PD, Van den DOEL M, De ZEEUW S, DUNCKER DJ (1998)
Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes.
Cardiovasc Res; 39: 121-135
- WANG Y, SU B, SAH VP, BROWN JH, HAN J, CHIEN KR (1998)
Cardiac hypertrophy induced by mitogen-activated protein kinase kinase 7, a specific activator for c-Jun NH₂-terminal kinase in ventricular muscle cells.
J Biol Chem; 273: 5423-5426
- WANGE RL, SMRCKA AV, STERNWEIS PC, EXTON JH (1991)
Photoaffinity labeling of two rat liver plasma membrane proteins with [³²P]γ-Azidoanilido GTP in response to vasopressin.
J Biol Chem; 266: 11409-11412
- WEISS HJ, TURITTO VT, BAUMGARTNER HR (1986)
Platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium in platelets deficient in glycoproteins IIb-IIIa, Ib, and storage granules.
Blood; 67: 322-330

- WEISS L, BULLORSKY E, ASHKENAZI YJ, SLAVIN S (1988)
Optimal time interval between myeloablative whole body irradiation and reconstitution with syngeneic bone marrow graft.
Bone Marrow Transplant; 3: 207-210
- WETTSCHURECK N, RUTTEN H, ZYWIETZ A, GEHRING D, WILKIE TM, CHEN J, CHIEN KR, OFFERMANN S (2001)
Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ in cardiomyocytes.
Nat Med; 7: 1236-1240
- WILKIE TM, SCHERLE PA, STRATHMANN MP, SLEPAK VZ, SIMON MI (1991)
Characterization of G-protein α subunits in the $G\alpha_q$ class: Expression in murine tissue and in stromal and hematopoietic cell lines.
Proc Natl Acad Sci U S A; 88: 10049-10053
- WILKIE TM, GILBERT DJ, OLSEN AS, CHEN XN, AMATRUDA TI, KORENBERG JR, TRASK BJ, De JONG P, REED RR, SIMON MI, JENKINS NA, COPELAND NG (1992)
Evolution of the mammalian G protein α subunit multigene family.
Nat Genet; 1: 85-91
- WU D, LEE CH, RHEE SG, SIMON MI (1992)
Activation of phospholipase C by α subunits of the G_q and G_{11} proteins in transfected cos-7 cells.
J Biol Chem; 267: 1811-1817
- WU KC, ZERHOUNI EA, JUDD RM, LUGO-OLIVIERI CH, BAROUCH LA, SCHULMAN SP, BLUMENTHAL RS, LIMA JA (1998)
Prognostic significance of microvascular obstruction by magnetic resonance imaging in patients with acute myocardial infarction.
Circulation; 97: 765-772
- YAMAGISHI H, KIM S, NISHIKIMI T, TAKEUCHI K, TAKEDA T (1993)
Contribution of cardiac renin-angiotensin system to ventricular remodelling in myocardial-infarcted rats.
J Mol Cell Cardiol; 25: 1369-1380
- YEO EL, SHEPPARD JA, FEUERSTEIN IA (1994)
Role of P-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions (an injury vessel wall model).
Blood; 83: 2498-2507
- YTREHUS K (2000)
The ischemic heart-experimental models.
Pharmacol Res; 42: 193-203
- YUHAS JM, STORER JB (1969)
On mouse strain differences in radiation resistance: hematopoietic death and the endogenous colony-forming unit.
Radiat Res; 39: 608-622

LITERATURVERZEICHNIS

YUSUF S, HAWKEN S, OUNPUU S, DANS T, AVEZUM A, LANAS F, McQUEEN M, BUDAJ A, PAIS P, VARIGOS J, LISHENG L (2004)

Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study.

Lancet; 364: 937-952

ZOLOTAREVA AG, KOGAN ME (1978)

Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice.

Cor Vasa; 20: 308-314

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Inhaltsstoffe der thrombozytären Granula nach Angaben von GAWAZ (1999) und RENDU und BROHARD (2001).....	10
Tab. 2:	Einteilung der α -Untereinheit der G-Proteine nach OFFERMANN (2003)	13
Tab. 3:	Vergleich der verschiedenen $G\alpha_q$ - und $G\alpha_{11}$ -Knockout-Kreuzungen anhand bestimmter Parameter nach Angaben von OFFERMANN et al. (1997b) und OFFERMANN et al. (1998).....	20
Tab. 4:	Vergleich von humanen und murinen Thrombozyten und Megakaryozyten anhand verschiedener Parameter nach SCHMITT et al. (2001).....	27
Tab. 5:	Ergebnisse für die Infarktgröße (HEUER, in Vorbereitung).....	32
Tab. 6:	Übersicht: Versuchsgruppen.....	36
Tab. 7:	Allgemeine biologische Daten.....	50
Tab. 8:	Ergebnisse der sonographischen Messungen zur linksventrikulären Kontraktilität (FS).....	51
Tab. 9:	Ergebnisse der planimetrischen Berechnungen	53

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Verschiedene Abbauwege reaktiver Radikale	6
Abb. 2:	Entstehung von Superoxid-Anionen	6
Abb. 3:	Aktivierung der G-Proteine	14
Abb. 4:	Signalübertragung durch das $G_{\alpha_{q/11}}$ -Protein	16
Abb. 5:	Herz und Ausgusspräparate der Koronargefäße einer C57BL/6- Maus (AHN et al. 2004)	26
Abb. 6:	Schema zum Versuchsablauf	36
Abb. 7:	Durchführung der sonographischen Messungen	40
Abb. 8:	Bestimmung des fractional shortening	41
Abb. 9:	Einführen der Metallkanüle in die Trachea	42
Abb. 10:	Exemplarische Darstellung der mit dem Polyethylenschlauch unterlegten Ligatur und der Färbung des Herzens	46
Abb. 11:	Darstellung der für die Vermessung wichtigen Schnittebenen am gefärbten Herzen	47
Abb. 12:	Fotografie eines Schnittes	48
Abb. 13:	Abnahme des fractional shortening	52
Abb. 14:	Einzeldaten und Mittelwerte für den Flächenquotienten von Infarkt zu area at risk	54
Abb. 15:	Einzeldaten und Mittelwerte für den Flächenquotienten von Infarkt zu linkem Ventrikel	54
Abb. 16:	Anteil der area at risk (AAR) an der Gesamtfläche der Herzschnitte (A_{ges})	55
Abb. 17:	Beispiel für einen relativ großen Infarkt	56
Abb. 18:	Beispiel für einen kleinen Infarkt	57
Abb. 19:	Flächenquotienten von Infarkt zu linkem Ventrikel – im Vergleich mit den Ergebnissen von HEUER (in Vorbereitung)	64
Abb. 20:	Flächenquotienten von Infarkt zu area at risk – im Vergleich mit den Ergebnissen von HEUER (in Vorbereitung)	64

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A _{ges}	Gesamtfläche
AAR	area at risk
ADP	Adenosindiphosphat
Akt	Proteinkinase Akt
AnAR	area non at risk
ATP	Adenosintriphosphat
bp	base pairs, Basenpaare
Ca ²⁺	Calcium
DAG	Diacylglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ERK	extrazellulär signal-regulierte Kinasen
FS	fractional shortening
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-protein-coupled receptor
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray
HDL	high-density-lipoprotein
I	Infarkt
IP ₃	Inositoltriphosphat
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal Kinase
LAD	left anterior descending coronary artery
LDL	low-density-lipoprotein
LV	linker Ventrikel
LVDd	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVDs	Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
M1	erste Ultraschallmessung
M2	zweite Ultraschallmessung
MAP-Kinasen	mitogen-aktivierte-Protein-Kinasen
MW	Mittelwert (arithmetisch)
Na ⁺	Natrium
PCR	polymerase chain reaction
PiP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PI ₃ K	Phosphatidylinositol-3-Kinase

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PKC	Proteinkinase C
PLC- β	Phospholipase C β
RV	rechter Ventrikel
SEM	standard error of mean
TxA ₂	Thromboxan A ₂

11 DANKSAGUNG

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. M. Stangassinger möchte ich herzlich für die Übernahme der Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München und für seine freundliche Unterstützung und große Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung der Arbeit danken.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher, Direktor des Instituts für experimentelle Onkologie und Therapieforschung an der Technischen Universität München, bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Für die Überlassung des Themas, vor allem aber für die gute Zusammenarbeit und für die zuverlässige Unterstützung in jeder Hinsicht möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn PD Dr. med. M. Seyfarth, bei Herrn Dr. med. H.-J. Weig – bei ihm insbesondere für die geduldige Durchsicht des Manuskriptes - und bei Herrn Dr. med. L. Bottflügel – bei ihm speziell für die Erstellung der Statistik - bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt für die sorgfältige Korrektur der Arbeit, sein außergewöhnliches Engagement und Verständnis für seine Doktoranden und seine jederzeit gewährte hilfsbereite und lebenswürdige Unterstützung.

Ebenso herzlich bedanke ich mich bei Herrn Dr. vet. med. C. Städele für die aufgewandte Geduld bei der Durchsicht der Arbeit, vor allem aber für die freundschaftliche Zusammenarbeit, seine Hilfsbereitschaft und konstruktiven Ratschläge, die mir aus mancher „Sackgasse“ heraus geholfen haben.

Mein ganz herzlicher Dank gilt auch Frau Dr. med. vet. K. Knote, Frau D. Grewe und Frau Dr. med. vet. U. Stegemann für ihre freundschaftliche Unterstützung, ihr stets offenes Ohr und die verständnisvolle Motivation.

Allen Mitarbeitern des Institutes, insbesondere Frau Dr. med. vet. J. Henke, Frau Dr. med. vet. C. Michaelis, Frau Dr. med. vet. U. Schillinger, Frau G. Wexel, ganz besonders Frau Hertel und Frau Pohlheimer, Frau Pichotka, Frau Leutz sowie allen Tierpflegern, insbesondere Frau R. Bergmeyr möchte ich hiermit meinen aufrichtigen Dank für die außergewöhnlich angenehme Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit aussprechen.

Meinen Freunden und Angehörigen danke ich für ihre Geduld und Motivation, die mir die Fertigstellung dieser Arbeit wesentlich erleichtert haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir durch ihre großzügige und liebevolle Unterstützung in jeglicher Hinsicht meine Ausbildung und die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

12 LEBENS LAUF

Name: Kerstin Winter
Anschrift: Weidenauer Str. 14 ½, 86633 Neuburg an der Donau
Geboren: 30. März 1979 in Erlangen
Familienstand: ledig
Mutter: Maria Winter, geborene Brückner, MTA
Vater: Martin Winter, Studiendirektor
Geschwister: Matthias Winter

Schul Ausbildung:

Sept. 1985 - Juli 1989 Grundschule in Neuburg an der Donau
Sept. 1989 - Juli 1998 Descartes-Gymnasium in Neuburg an der Donau
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

Nov. 1998 - Febr. 2004 Studium der Veterinärmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
3. März 2004 Approbation als Tierärztin
März 2004 Beginn der Promotionsarbeit am Institut für
experimentelle Onkologie und Therapieforschung der
Technischen Universität München